GE Healthcare

Biacore

Biacore S51

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

GE imagination at work

JJ-3019-01
(71-3199-31)

目次

1.セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

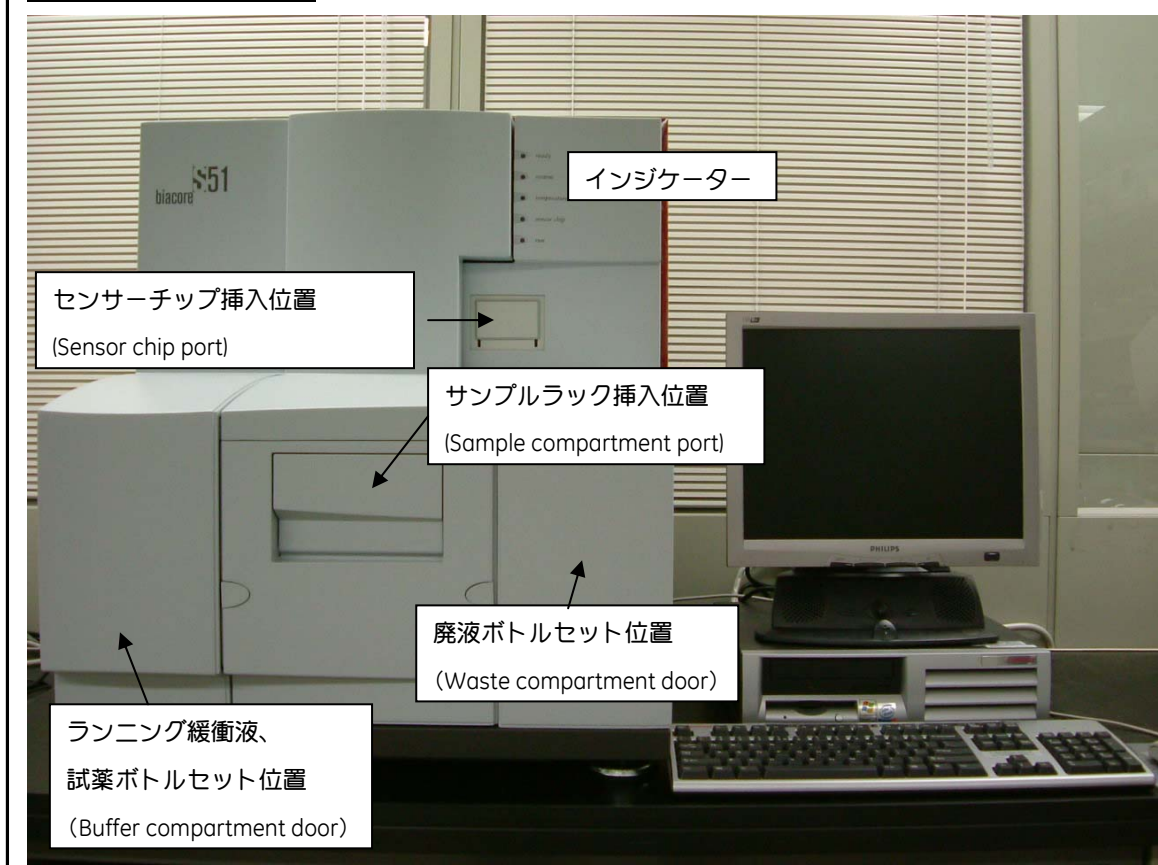
1-1-1. 電源の立ち上げと緩衝液の準備

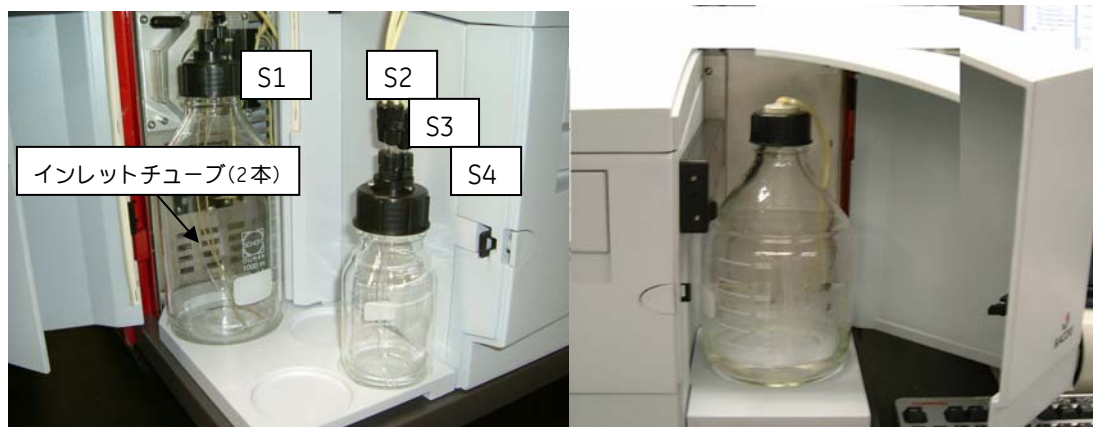
電源安定化装置 → プリンター → モニター → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。

注）システム本体の電源を入れると、本体のフロント右上にあるインジケーターのすべてのランプが数秒間点灯し、リセットされる。Ready のランプが点灯し、Temperature のランプは点滅、もしくは点灯する。

システム内部の配置

インジケーター
センサーチップ挿入位置
(Sensor chip port)
サンプルラック挿入位置
(Sample compartment port)
廃液ボトルセット位置
（Waste compartment door）
ランニング緩衝液、
試薬ボトルセット位置
（Buffer compartment door）

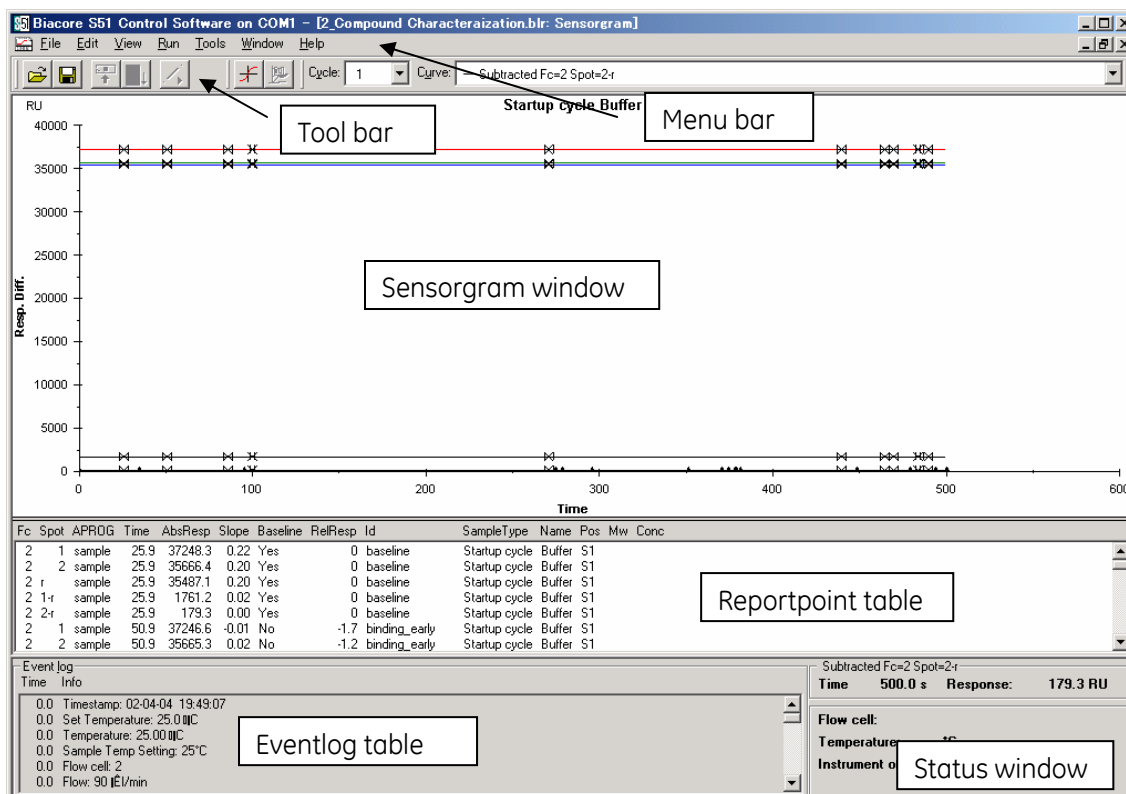
↓

システム本体左側のドアを開け、ランニング緩衝液ボトル、試薬ボトルを配置し、チューブをセットする。
6 本のチューブの基本的な配置は以下の通りである。
・2 本のインレットチューブ+S1 チューブ →ランニング緩衝液ボトル
・S2,S3,S4 チューブ →超純水を入れた試薬ボトル
（測定条件によっては、S3,S4 のチューブを任意の試薬ボトルに入れる。）

同様に、本体右側のドアを開け、廃液ボトルを配置し、チューブをセットする。

ランニング緩衝液ボトル、試薬ボトルのセット　　廃液ボトルのセット

（補足）ランニング緩衝液

ランニング緩衝液として、弊社から下記の数種の緩衝液を発売している。下記緩衝液の使用方法に関しては、緩衝液に添付の説明書を参照のこと。
PBS 10× （BR-1006-72）
（100 mM phosphate buffer/27mM KCl/1.37M NaCl/27mM KCl（pH7.4））
HBS-EP + 10× （BR-1006-69）
（100 mM HEPES/1.5 M NaCl/30 mM EDTA/0.5 % Surfactant P20（pH7.4））
HBS-P + 10× （BR-1006-71）
（100 mM HEPES/1.5 M NaCl/0.5 % Surfactant P 20（pH7.4））
HBS-N + 10× （BR-1006-70）
（100 mM HEPES/0.15 M NaCl（pH7.4））
HBS-N （BR-1003-69）
（10 mM HEPES/0.15 M NaCl（pH7.4））
HBS-EP （BR-1001-88）
（10 mM HEPES/0.15 M NaCl/3mM EDTA/0.005 % Surfactant P20（pH7.4））
HBS-P （BR-1003-68）
（10 mM HEPES/0.15 M NaCl/0.005 % Surfactant P 20（pH7.4））
実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能である。各自で調製する場合は、0.22um フィルターでろ過を行い、使用直前に十分脱気を行う。

1-1-2.　コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面左下の **Start** から、BIA programs 中の **Biacore S51 Control Software** をクリックする。

- Menu bar　：すべての操作コマンドが含まれる。
- Tool bar　：使用頻度の高い操作コマンドをアイコン化表示。
- Sensorgram window　：センサーグラムをリアルタイムに表示。
- Report point table　：任意の時間におけるレスポンスを表示。
- Eventlog window　：測定中の装置動作内容を表示。Sensorgram window の X 軸（時間軸）上の時刻に対応。
- Status window　：システムの状態をリアルタイムに表示。

1-2. システムの準備

1-2-1. センサーチップの挿入（Insert Chip）

Biacore S51 コントロールソフトウェアを起動すると、システム本体右前面のセンサーチップポートが自動的に開く。

↓

センサーチップを印字面の両側の矢印の方向でセンサーチップポートに挿入する。

↓

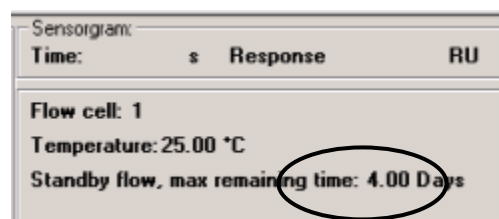
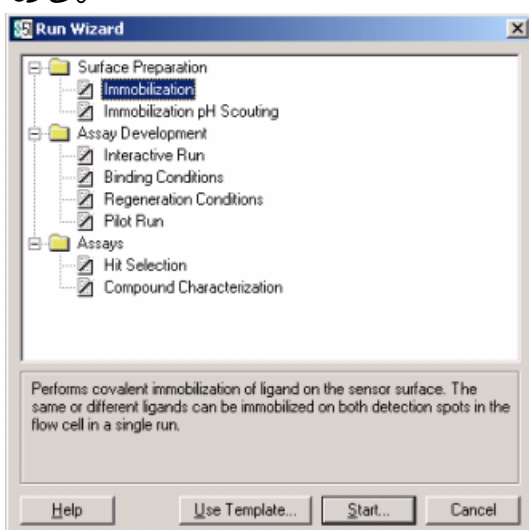
センサーチップポートを手で押し閉める。

モニター画面上の **Insert Chip** ウィンドウの設定を行う。
Chip type:と **Chip　status** を選択する。新品を使用する際は、さらに **Chip id:**、必要に応じて、**Chip lot no(optional):**を入力する。Chip id:にはセンサーチップの開封年月日など任意に入力する。ロット番号はセンサーチップ本体、およびパッケージに記載されている番号を入力するのが望ましい。（再利用のセンサーチップを使用する際は、そのセンサーチップに対応した id 番号を Chip id:に入力する。6 ページを参照。）

↓

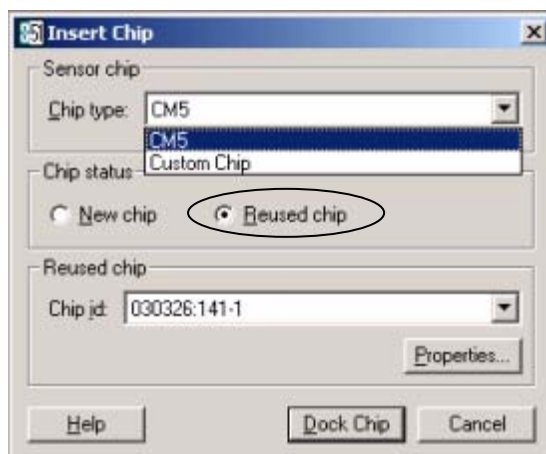
設定後、**Dock Chip** をクリックする。

↓

Run Wizard ウィンドウが自動的に表示され、システムは Standby flow モードになる。Standby flow モードとは、低流速でランニング緩衝液を送液するモードである。

測定に入る場合は、Run Wizard の測定プログラムを選択し、**Start** をクリックする。測定プログラムに関しては、各章を参照のこと。

（補足）センサーチップの固定化履歴

以前使用したセンサーチップを再び使用する場合、そのセンサーチップの固定化履歴を確認することができる。

Insert Chip
Sensor chip
Chip type: CM5
CM5
Custom Chip
Chip status
New chip Reused chip
Reused chip
Chip id: 030326:141-1
Properties...
Help Dock Chip Cancel

Chip status の **Reused chip** を選択し、以前使用時に使用した id 番号を入力する。

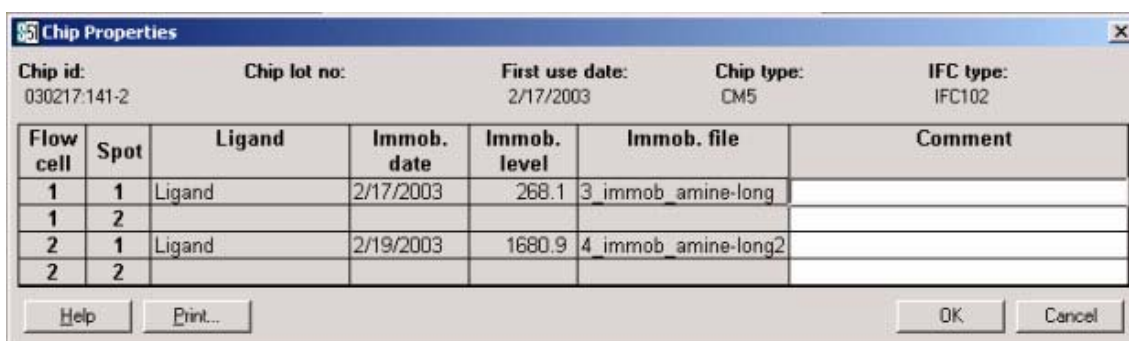
↓

Properties...をクリックすると、そのセンサーチップの固定化履歴が表示される。

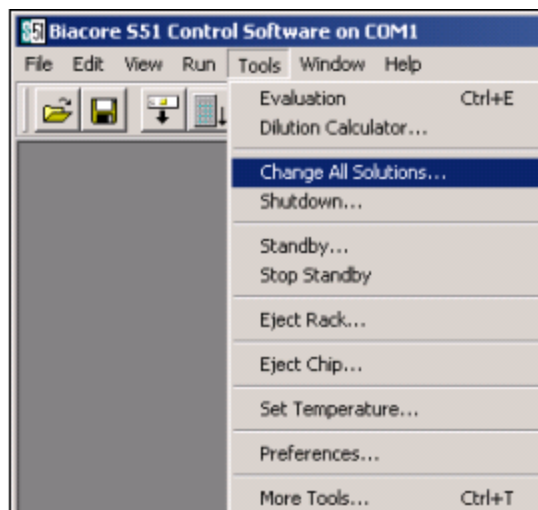
Chip Properties

Chip id:	Chip lot no:	First use date:	Chip type:	IFC type:
030217:141-2		2/17/2003	CM5	IFC102

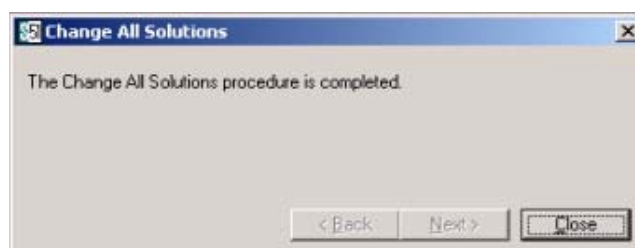
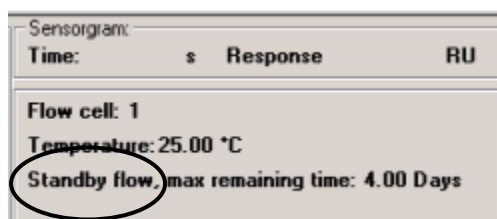
Flow cell	Spot	Ligand	Immob. date	Immob. level	Immob. file	Comment
1	1	Ligand	2/17/2003	268.1	3_immob_amine-long	
1	2					
2	1	Ligand	2/19/2003	1680.9	4_immob_amine-long2	
2	2					

Help Print... OK Cancel

1-2-2. ランニング緩衝液の置換（Change All Solutions...）

Tools□Change All Solutions...をクリックする。（所要時間約 4 分 30 秒）

↓

Start をクリックする。

↓

約 4 分 30 秒後、終了を知らせるウィンドウが表示される。

Close をクリックする。システムは自動的に Standby flow モードに入る。

1-2-3.　測定温度の設定

Tools → Set Temperature…をクリックする。

4～45℃の範囲で数値を入力し、**OK** をクリックする。（通常 25℃）

1-2-4. SPR シグナルの校正（Normalize）

（測定用センサーチップをドックするごとに実施するのが望ましい。）

Tools → More Tools...をクリックする。（所要時間約 11 分）

Biacore S51 Control Software on COM1

File Edit View Run Tools Window Help

Evaluation Ctrl+E
Dilution Calculator...
Change All Solutions...
Shutdown...
Standby...
Stop Standby
Eject Rack...
Eject Chip...
Set Temperature...
Preferences...
More Tools... Ctrl+T

↓

Tools

Maintenance Tools
Desorb
Desorb and Sanitize
Superclean
Test Tools
Normalize
System Check
Service Tools
Flow System Wash
Software Problem Report

Normalizes the signal in all flow cells.
Total run time is about 11 minutes.
NOTE: Do not normalize with the maintenance chip.

Last Run Time: 17-Jan-05 18:23

Help Start... Cancel

Normalize を選択して Start...をクリックする。

↓

Normalize

This procedure normalizes the detector signal. Total run time is about 11 minutes.

Required solution (from Maintenance Kit Series S):

BIAnormalizing solution

< Back | Next > | Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

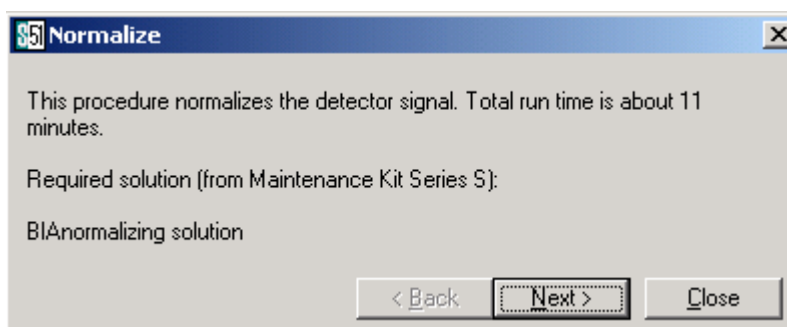
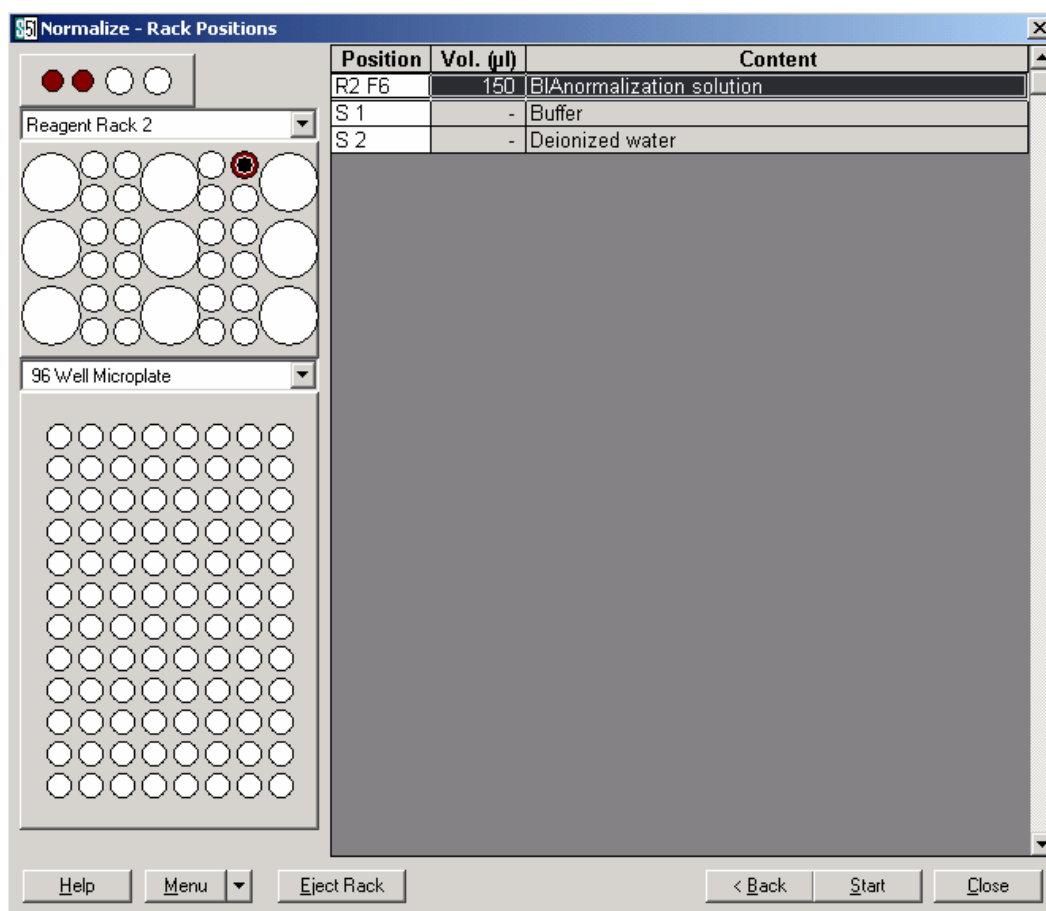
↓

Normalize - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (μl)	Content
R2 F6	150	BIAnormalization solution
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

Help | Menu | Eject Rack | < Back | Start | Close

BIA メンテナンスキット中の **BIAnormalizing solution** 150 μl を 7mm プラスチックバイアルに分注後、ラックトレイの所定の位置にセットし、システムに挿入する。（システムへの試薬類のセットに関しては、11 ページ以降を参照。）

↓

Start をクリックする。

↓

終了後、Normalize が終了したことを知らせるウィンドウが表示される。
Close をクリックする。システムは自動的に Standby flow モードに入る。

（補足）バイアルとラックとラックトレイ

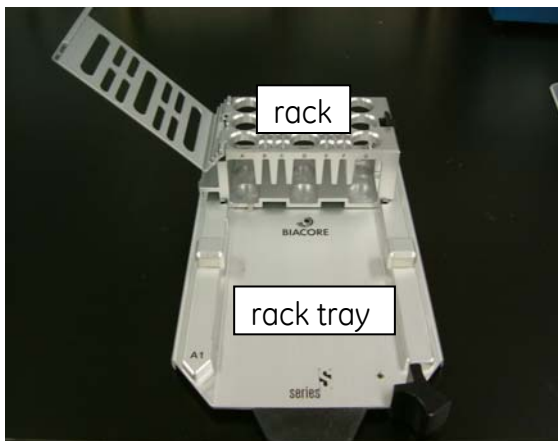
使用するバイアルには必ず専用のラバーキャップを被せる。

7mm プラスチックバイアル(BR-1002-12)
専用ラバーキャップ **type 3** (BR-1005-02)
主にサンプルを入れる。
最大容量 800 μl。

16mm ガラスバイアル (BR-1002-09)
専用ラバーキャップ **type 2** (BR-1004-11)
主に試薬を入れる。
最大容量 4 ml。

2 ml プラスチックバイアル (BR-1002-14)
専用ラバーキャップ **type 2** (BR-1004-11)
最大容量 2 ml。

バイアルを立てるホルダーをラックといい、ラックをセットするトレイをラックトレイという。

ラックトレイにはラックに加え、96well もしくは 384well のマイクロプレートをセットすることができる。

rack
rack tray

1-2-5. ラックトレイの取り出しとセット

Tools → **Eject Rack...**もしくは Tool bar の をクリックする。

Wizard 測定プログラム作成後、実行直前にラックトレイをセットする場合は、Wizard 最終 Rack Positions 画面の左下の Eject Rack をクリックする。

約 30 秒で Sample compartment port が開く。

↓

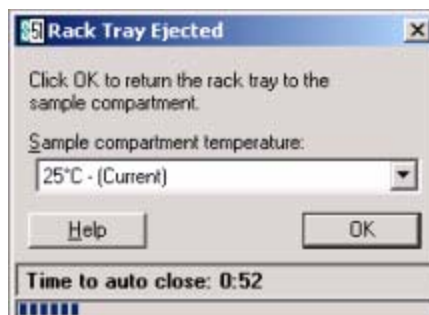
システム内に予めラックトレイがセットされている場合は、そのラックトレイが手前にスライドされる。ラックトレイ下の円形の金属突起を押し込むと、ロックが解除される。

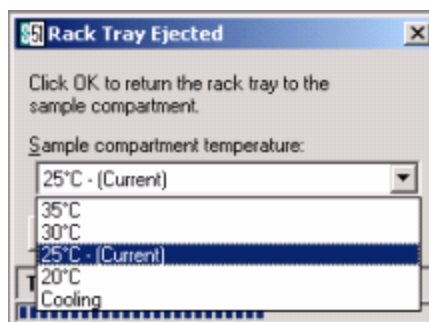
↓

必要な試薬類をセットしたラックトレイを挿入する。ラックトレイの突起部分をカチャと音がするまで押し込む。

↓

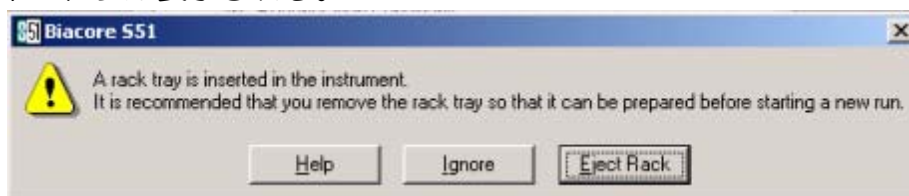
Rack Tray Ejected ウィンドウが表示される。

↓

Sample compartment port の温度を調整する場合は、この時点で、**Sample compartment temperature:** の▼をクリックし、温度を選択する。

↓

Sample compartment port は 60 秒で自動的に閉まる。ラックトレイ挿入後直ちに閉めたい場合は **OK** をクリックする。

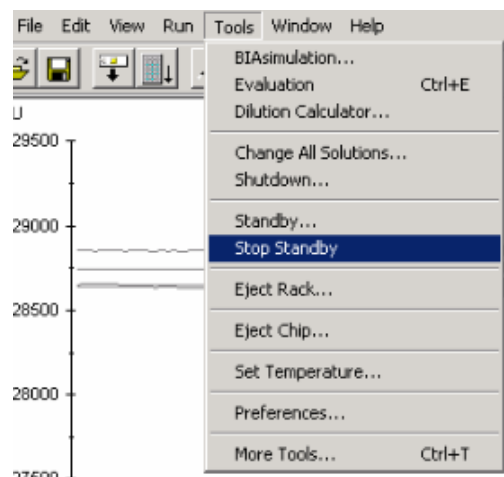
（補足）ラックトレイに関する警告ウィンドウ

測定プログラム作成開始時、装置内にラックトレイが入っている状態であれば、下記ウィンドウが表示される。

↓

その時点でラックトレイを取り出す場合は **Eject Rack**、測定プログラム実行直前にラックトレイを交換する場合は **Ignore** を選択する。

1-2-6. Standby の停止

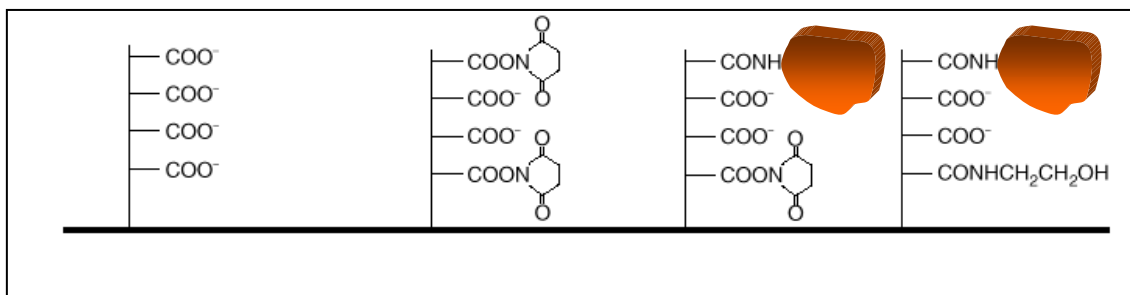
ランニング緩衝液を交換する場合など、一時的に Standby flow モードを停止する場合は、Menu bar の **Tools** → **Stop Standby** をクリックする。

File Edit View Run Tools Window Help
BIAsimulation...
Evaluation Ctrl+E
Dilution Calculator...
Change All Solutions...
Shutdown...
Standby...
Stop Standby
Eject Rack...
Eject Chip...
Set Temperature...
Preferences...
More Tools... Ctrl+T

約 10 秒後、送液は停止する。
Status window から Standby flow が消えていることを確認する。

Flow cell: 2
Temperature: 25.00 °C

2. リガンドの固定化

（リガンド）
相互作用を検討する分子のうち、センサーチップに固定化する分子を「リガンド」と言う。リガンドの精製度は、リガンド結合の特異性やキャパシティーに大きく作用するので非常に重要な要因となる。90％以上の精製度のリガンドを使用する。

（リガンドの固定化方法）
共有結合による固定化
□アミンカップリング法(Amine Coupling)
リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基あるいはリジン残基の□-アミノ基）を利用して固定化する方法。
センサーチップ表面上の CM デキストランのカルボキシル基を縮合剤 EDC を混合した NHS で活性化し、プレコンセントレーション効果を利用してイオン交換的に濃縮したリガンドをカップリングする。その後、未反応の活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

② 表面チオールカップリング法(Surface Thiol Coupling)
等電点が 4.0 以下の酸性リガンドに有効である。
リガンド表面に存在するカルボキシル基を利用して固定化する方法。
リガンドのカルボキシル基を PDEA 化し、チオール基を導入したセンサーチップ表面に S-S 結合で固定化する。PDEA 化することによりリガンドの等電点を上げることができるため、プレコンセントレーション効果が得やすくなる。
親和性を利用した固定化
安定性の悪いリガンド、低い pH に対して弱いリガンドに有効である。
リガンドと強い親和性を持つキャプチャー分子（リガンドに対する抗体等）をセンサーチップ表面に共有結合により固定化し、その表面にリガンドを添加しトラップする方法。相互作用測定 1 サンプルごとにリガンドを捕捉しなおすため、必要となるリガンド量は多い。しかし、常に新鮮なリガンドを使用できる。

（アミンカップリング法によるリガンドの固定化時に準備するもの）

●センサーチップ CM5 certified grade

●ランニング緩衝液

トリスあるいはグリシン緩衝液等の 1 級アミンを含む緩衝液は避ける。

●アミンカップリングキット

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

- EDC(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochroride)
- NHS(N-hydroxysuccinimide)
- 1 M ethanolamine hydrochloride 溶液(pH 8.5)

（試薬の調製方法）

キットに添付されている説明書にしたがってい、EDC および NHS それぞれを十分脱気した 10 ml の MilliQ 水に溶解し、直ちに 200 μl ずつ 7mm プラスチックバイヤルにそれぞれ小分けし、専用のラバーキャップをして使用直前まで -20 ℃で冷凍保存する。一つのリガンドの固定化に対して一組の試薬が必要である。固定化直前に冷凍庫から取り出し、溶解後使用する。溶解後の試薬の再凍結は避け、廃棄する。エタノールアミンは、溶液で供給されており、4℃で保存する。200 μl ずつ小分けしておくか、使用する直前にサンプリングする。

●リガンド希釈用 10mM 酢酸緩衝液

リガンドを 5～200ug/ml 程度になるよう 10mM 酢酸緩衝液で希釈する。希釈に使用する酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5 以上低い pH か、Immobilization pH Scouting 操作により決定した pH を用いる。pH4.0 以下の 10mM 酢酸緩衝液は使用しない。

（リガンドの必要固定化量（RU））

Biacore は、センサーチップに固定化したリガンドに結合する測定対象分子(アナライト)を質量変化として検出する。したがって、原理上、アナライトの分子量(Da)が大きければ大きいほど、結合により得られるレスポンスは大きい。またリガンドの固定化量(RU)つまり数(mol)は多いほど、結合できうるアナライト数(mol)が増えるため、得られるレスポンス(RU)は大きくなる。

Rmax とは固定化したすべてのリガンドにアナライトが飽和した際に得られるアナライトのレスポンス(RU)のことで、理論上の最大結合量(RU)である。

Rmax の値はリガンドの分子量、固定化量、およびアナライトの分子量から予め計算により見積もることができる。リガンドとアナライトが 1:1 で結合する場合、固定化したリガンドの mol 数とアナライトの最大結合量 mol 数は等しいことから、以下の式が成り立つ。

$$R_L / MW_L = Rmax / MW_A$$

MW ；アナライトの分子量（Da）
MW_L ；リガンドの分子量 （Da）
R_L ；リガンドの固定化量（RU）
Rmax ；アナライトの最大結合量（RU）

この式を変形することで、Rmax を求めることができる。

$$Rmax = R_L \cdot MW_A / MW_L$$

余裕を持って相互作用を検出するには、Rmax を最低 30RU 確保するのが望ましい。実験前に Rmax として 30RU 以上確保するに必要なリガンドの固定化量を計算しておく。
例えば、40kDa のリガンドと 200Da のアナライトの相互作用測定を行う際に、必要とされる固定化量は以下のように計算される。

$$R_L = (MW_L \cdot Rmax) / (MW_A \cdot MW_L)$$
$$= (40{,}000 \cdot 50) / (200 \cdot 1)$$
$$= 10{,}000$$

この場合、リガンドの固定化量は 10,000RU 以上必要となる。

（注）Rmax はアナライトの理論上の最大結合量（RU）を意図して使用される以外に、実験解析結果から得られる最大結合量（RU）を意味する場合がある。理論上の最大結合量（RU）を意図する場合は、**理論的 Rmax** と言い使い分けることがある。実験上得られる Rmax は理論上のその値より小さいことが多い。理論的 Rmax は、固定化したすべてのリガンドが 100%の活性を維持し、アナライトの結合部位が固定化に利用されることなく、立体障害がない環境であると仮定した場合の計算上の数値である。

2-1. リガンド希釈液の至適 pH の選択（Immobilization pH Scouting）

（Immobilization pH Scouting の目的）

共有結合による固定化時、リガンドは等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈した状態で添加することにより、効率よく固定化することができる。センサーチップ CM5 の表面には無数のカルボキシル基が存在し、負に帯電している。リガンドは、等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈することにより、表面電荷を正に荷電させることができる。リガンドは、センサーチップ表面に静電気的な相互作用により、高濃度で添加するのと同等の環境を作り出す（リガンドを濃縮する）ことができる。これをプレコンセントレーション効果と呼ぶ。

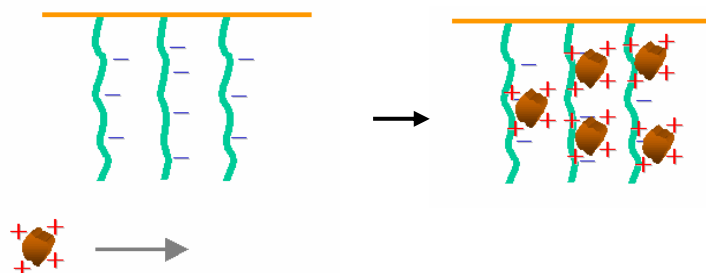
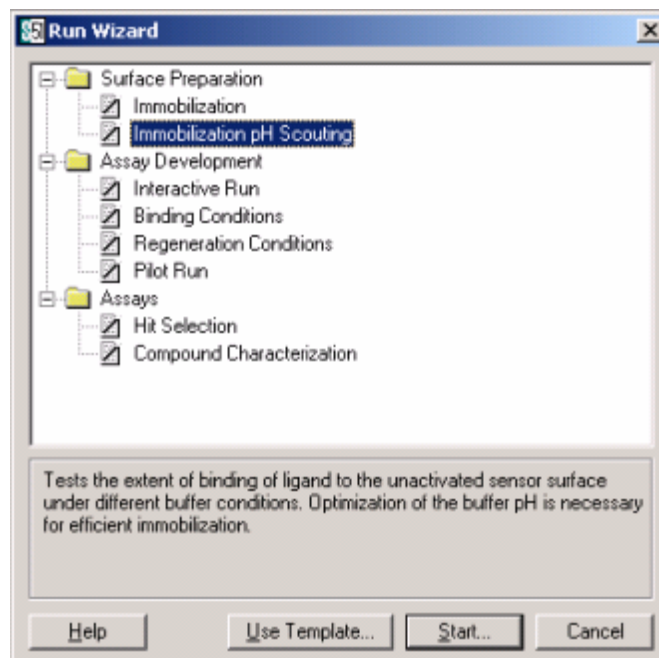
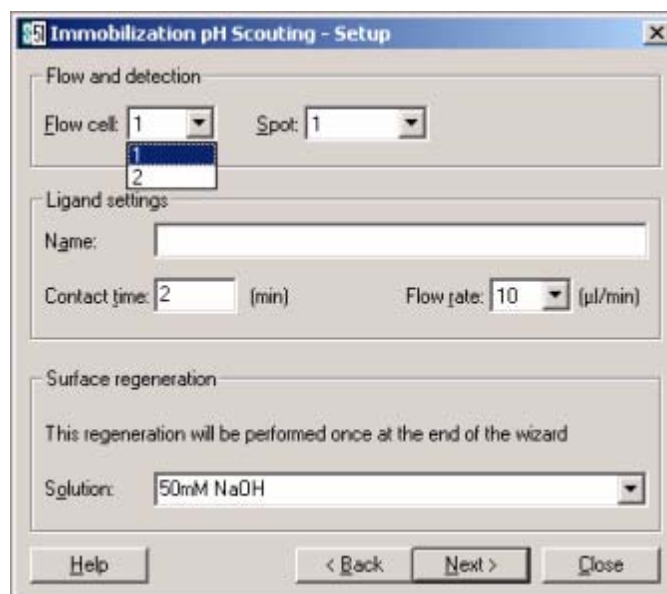
通常、リガンド希釈液は、等電点よりも 0.5 以上低い pH の 10 mM 酢酸緩衝液条件を使用するが、等電点が不明な場合には、Immobilization pH Scouting 試験を実施することにより、プレコンセントレーション効果が得られる pH を調べることができる。なお、予めリガンドの等電点が既知の場合においても、酢酸緩衝液による希釈倍率の問題や、アミノ酸配列からの計算上の等電点と表面電荷の違いにより十分にプレコンセントレーション効果が得られない場合があるため、固定前に Immobilization pH Scouting 試験を実施することをお奨めする。

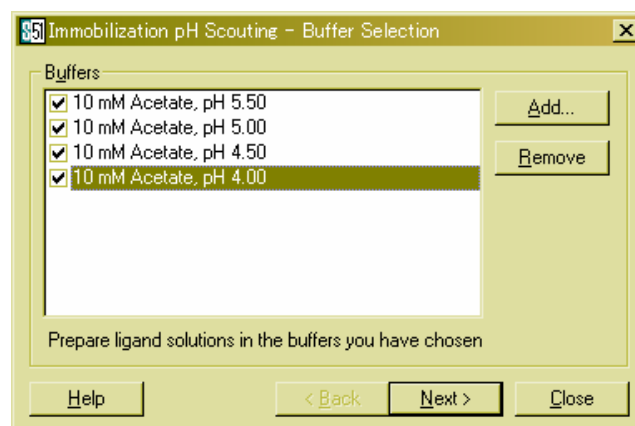
この操作では、**未使用のスポット（固定化予定スポット）**を使用する。

リガンドを最終濃度で 5～50 ug/ml になるよう各 pH の緩衝液で希釈する。

- 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）　100 μl
- 10 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）　100 μl
- 10 mM 酢酸緩衝液（pH 4.0）　100 μl

この操作により**リガンドは固定化されることはない**。添加終了後、ランニング緩衝液に置換され、静電気的にセンサーチップ表面に結合したリガンドは速やかに解離する。しかし、リガンドがセンサーチップ表面に非特異的吸着を起こすことがあるため、添加終了後、50mM NaOH を添加することにより洗浄を行う。

Immobilization pH Scouting に使用したスポットはそのまま固定化に利用することができる。

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリックする。

Immobilization pH Scouting を選択し、**Start...**をクリックする。

↓

試験する緩衝液にチェックを付け、**Next >**をクリックする。
（ウィンドウ内の **Add...**を選択すると、その他の pH の緩衝液を追加することができる。また **Remove** で削除することもできる。）

↓

Immobilization pH Scouting - Setup

Flow and detection

Flow cell: 1 Spot: 1

1
2

Ligand settings

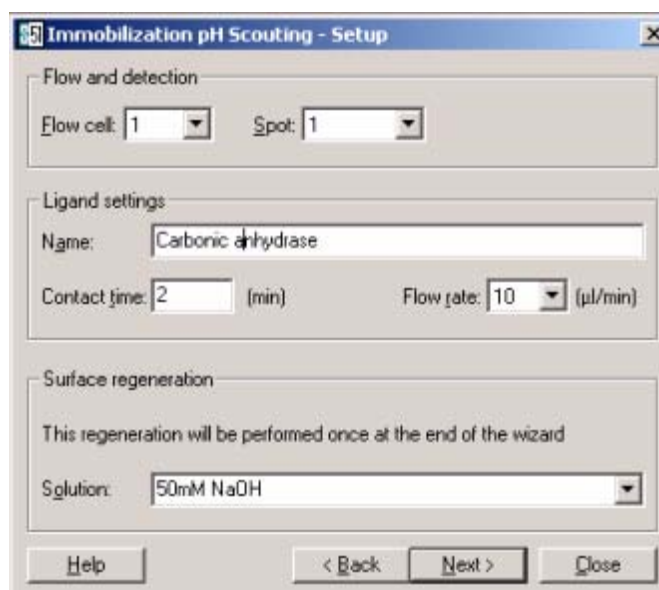
Name:

Contact time: 2 (min) Flow rate: 10 (µl/min)

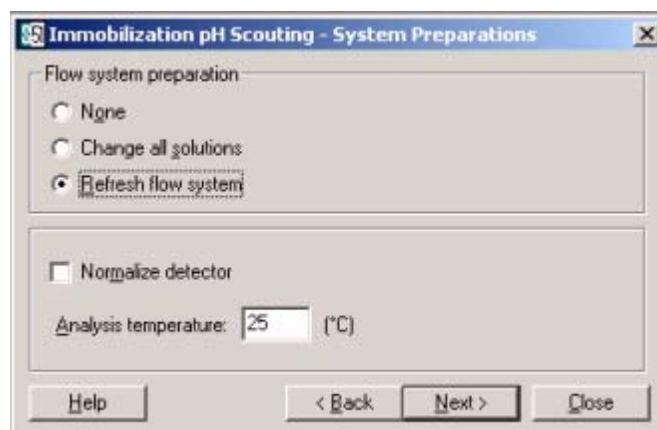
Surface regeneration

This regeneration will be performed once at the end of the wizard

Solution: 50mM NaOH

Help < Back Next > Close

固定化する **Flow cell** と **Spot** を設定する。

↓

フローセルとスポット

1 枚のセンサーチップ上にはフローセル(Flow Cell)と呼ばれる反応セルが 2 つあり、さらに各々のフローセルにはリガンドを固定化するスポット（Spot）が 2 つ存在する。Spot1、Spot2 には別々のリガンドを固定化することができる。Spot r はリファレンス専用スポットであり、リガンドを固定化することはできない。

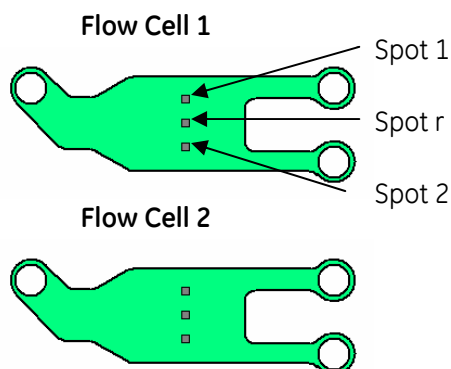
Flow Cell 1

Spot 1

Spot r

Spot 2

Flow Cell 2

Immobilization pH Scouting - Setup
Flow and detection
Flow cell: 1 Spot: 1
Ligand settings
Name: Carbonic anhydrase
Contact time: 2 (min) Flow rate: 10 (μl/min)
Surface regeneration
This regeneration will be performed once at the end of the wizard
Solution: 50mM NaOH
Help < Back Next > Close

次に Ligand settings の項目で、**Name:**に固定化するリガンドの名前を入力し **Contact time:**（1～2min）と **Flow rate:**（ 通常 10 μl/min、リガンド使用可能量に応じ 2, 5 μl/min に設定可能）を入力する。
Surface regeneration の項目はプレコンセントレーション後のセンサーチップ表面の洗浄操作である。**Solution:**で 50mM NaOH を選択する。設定後、**Next >**をクリックする。

↓

Immobilization pH Scouting - System Preparations
Flow system preparation
None
Change all solutions
Refresh flow system
Normalize detector
Analysis temperature: 25 (°C)
Help < Back Next > Close

Flow system preparation で **Refresh flow system** を選択する。直前に Change all solution 実行している場合は、**None** を選択する。
Analysis temperature:は固定化時の温度（通常 25℃）に設定し、**Next >**をクリックする。

↓

Immobilization pH Scouting - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (µl)	Content
R2 B1	47	Carbonic anhydrase in 10 mM Acetate, pH 5.50
R2 B2	47	Carbonic anhydrase in 10 mM Acetate, pH 5.00
R2 B3	47	Carbonic anhydrase in 10 mM Acetate, pH 4.50
R2 B4	47	Carbonic anhydrase in 10 mM Acetate, pH 4.00
R2 F6	55	50mM NaOH
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

Help Menu Eject Rack < Back Start Close

ウィンドウ右側のテーブルで必要サンプル量（μl）と位置を確認する。サンプル位置は左側のラック画面上のバイアルをクリックすることでも確認できる。サンプルの位置を変更する場合には、ラック画面上のバイアルにカーソルを移動し、望みの位置にドラッグする。移動先のバイアル容量が異なる場合は、必要サンプル量 Vol.(μl)が変更されるので注意する。

↓

ラックにバイアルをセットし、ラックトレイを挿入する。

↓

画面の Rack Positions ウィンドウ中の **Start** をクリックする。

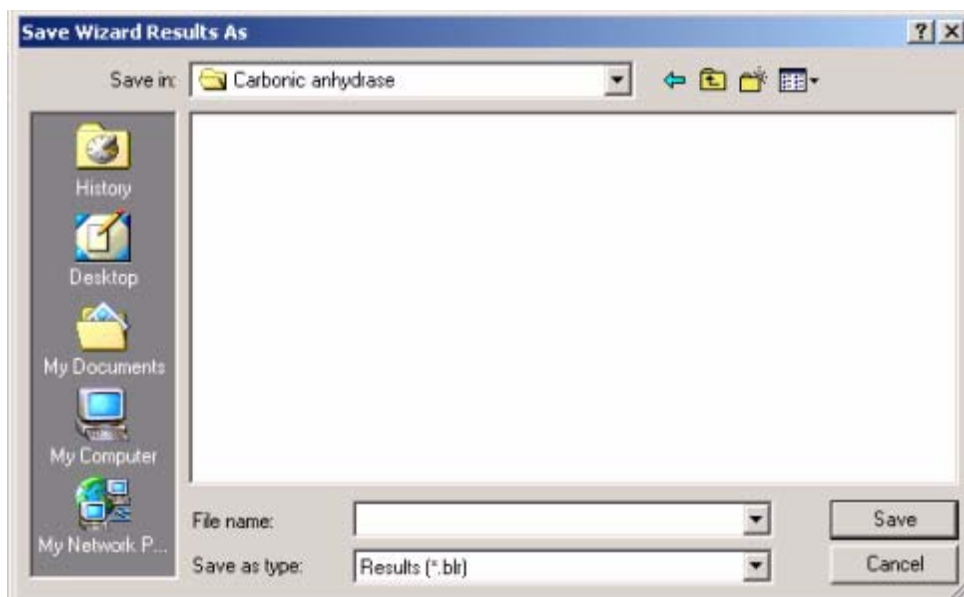
↓

Biacore S51

Do you want to save current wizard template?

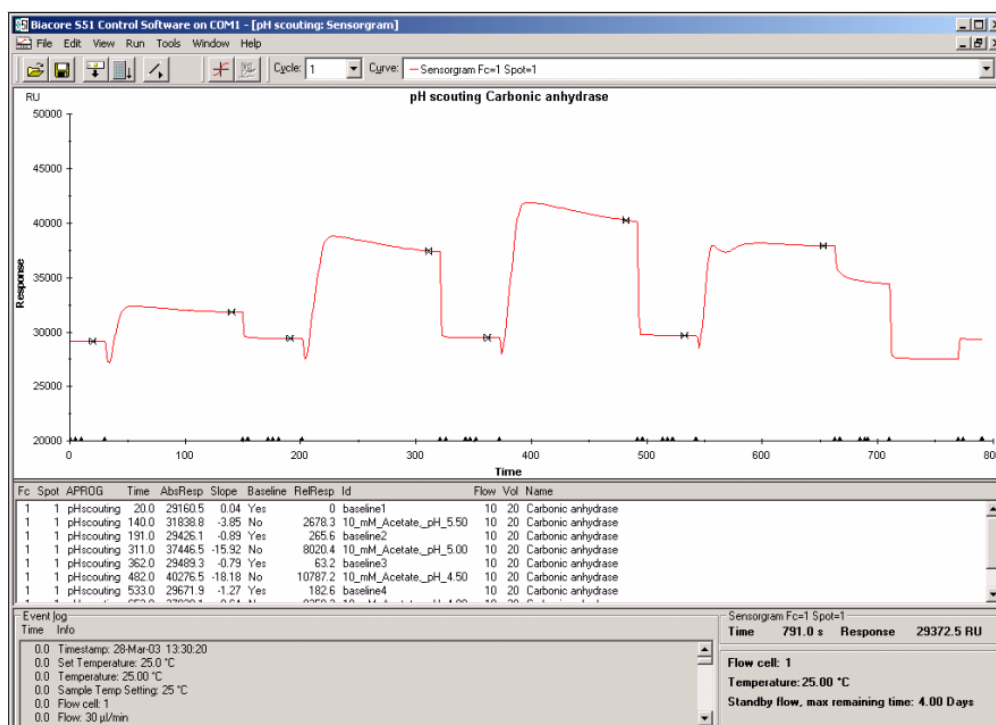
Save Save As... Don't Save Cancel

設定した Wizard を保存する場合は **Save** もしくは **Save As...**を選択し、保存先、File name:を入力し、**Save** する。（Wizard は測定結果と一対で保存されるため、通常 **Don't Save** を選択することが多い。）

↓

Save in：に測定結果の保存先（**C：＼Bia Users＼（各自のフォルダ）下**）を選択し、**File name:**を入力し、**Save** すると測定が開始される。

↓

各 pH の酢酸緩衝液に希釈したリガンド溶液が、順次添加される。

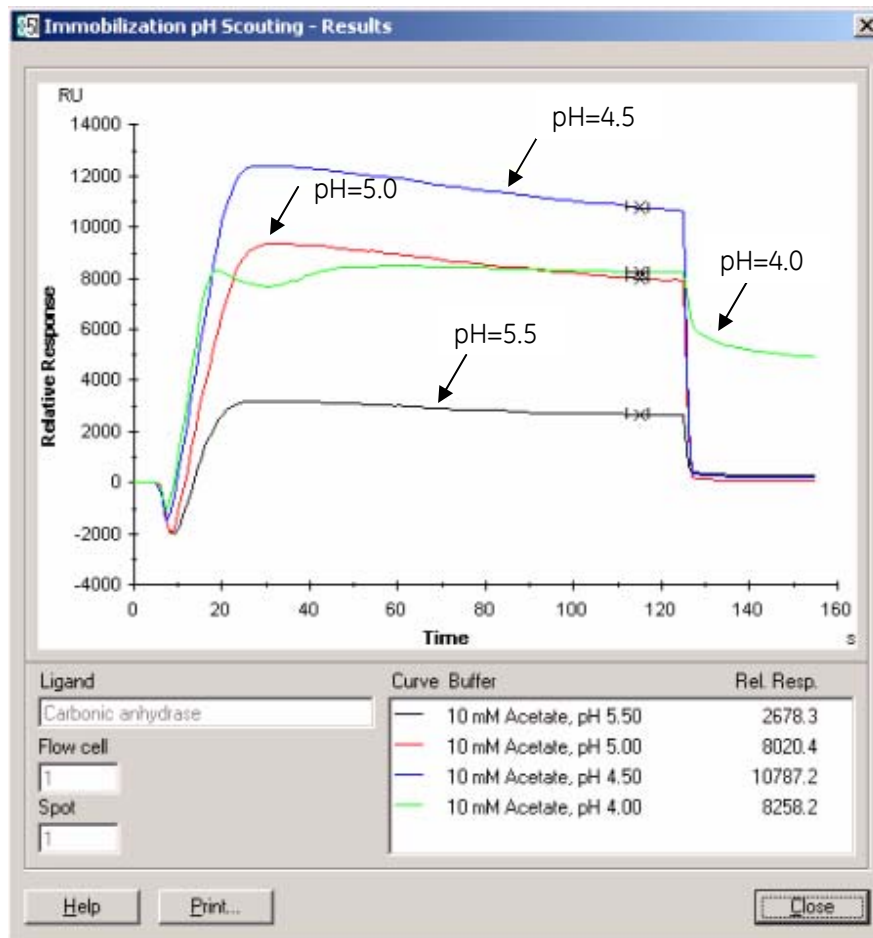
↓

Immobilization pH Scouting 終了後、装置は **Standby flow の状態**になる。Standby flow とは定流速でランニング緩衝液を供給する動作である。

↓

測定終了後以下のようなレポートが表示される。

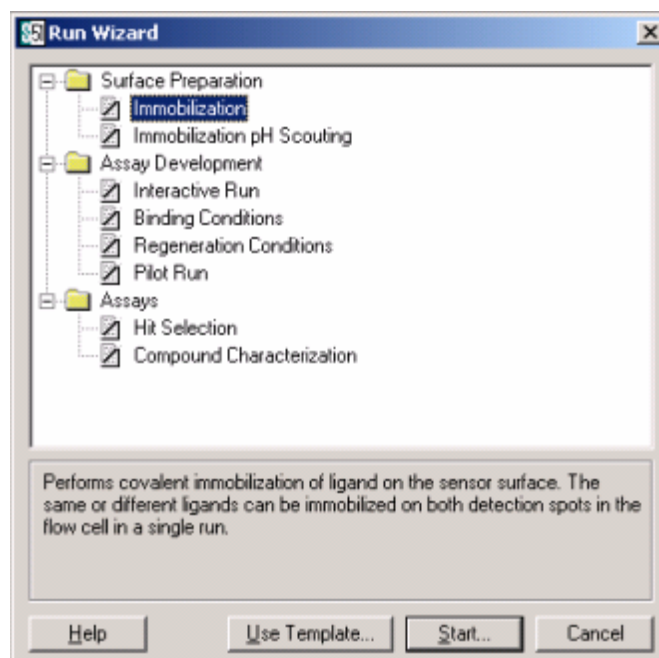
Immobilization pH Scouting - Results

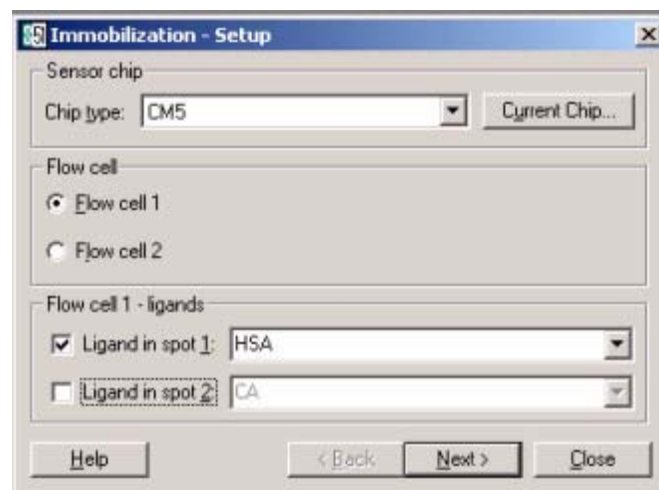
Curve	Buffer	Rel. Resp.
—	10 mM Acetate, pH 5.50	2678.3
—	10 mM Acetate, pH 5.00	8020.4
—	10 mM Acetate, pH 4.50	10787.2
—	10 mM Acetate, pH 4.00	8258.2

Ligand: Carbonic anhydrase
Flow cell: 1
Spot: 1

（結果の評価）

必要固定化量を十分上回る **Rel.Resp** が得られる pH を選択する。プレコンセントレーション効果が高くても、リガンド添加終了後のセンサーチップ表面への吸着が多い pH は避けるのが望ましい。また、プレコンセントレーション効果はリガンド濃度の影響を受けるため、リガンド濃度が高いほどセンサー表面に濃縮できる量も増える。プレコンセントレーション効果が十分量得られない場合は、濃度を上げ、再検討する。(例：10ug/ml in 10mM Acetate pH5.0 → 100 ug/ml in 10mM Acetate pH5.0)。pH4 でも全くプレコンセントレーション効果が得られない場合は、他の固定化方法（表面チオールカップリング法等）に変更する。

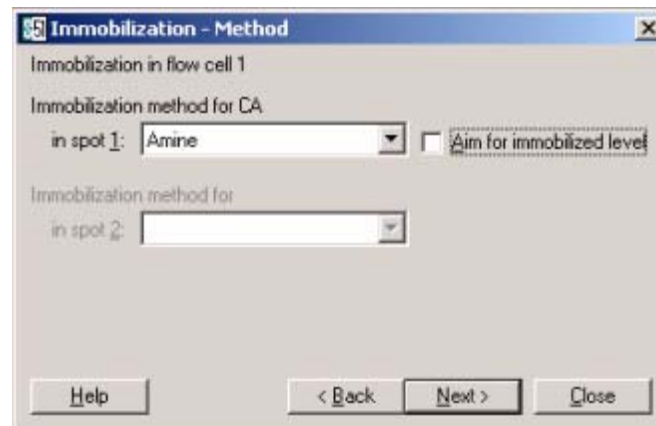
2-2. 共有結合によるリガンドの固定化（Immobilization）

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリックする。

Immobilization を選択し、**Start** をクリックする。

↓

Chip type:に **CM5**、Flow cell：固定化に使用するフローセル、Flow cell - ligands :
に固定化する spot を選択し、リガンド名を入力する。

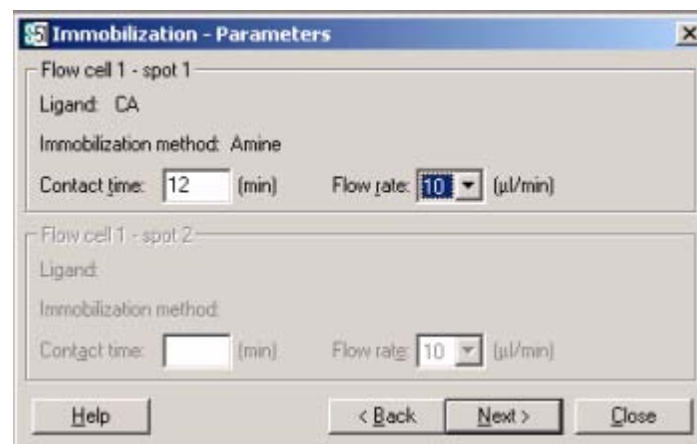
設定後、**Next >**をクリックする。

↓

Immobilization - Method
Immobilization in flow cell 1
Immobilization method for CA
in spot 1: Amine
Aim for immobilized level
Immobilization method for
in spot 2:
Help　< Back　Next >　Close

選択した spot に固定化方法を選択する。Amine の他に Surface Thiol と Custom Methods が選択可能である。Custom Methods は、アミンカップリング法、表面チオールカップリング法以外の固定化方法を使用する際に選択する。ビオチン化リガンドをセンサーチップ SA に固定化する際にも用いる。（固定化量を調節する場合は、**Aim for immobilization level** にチェックを入れる。）

設定後、**Next >**をクリックする。

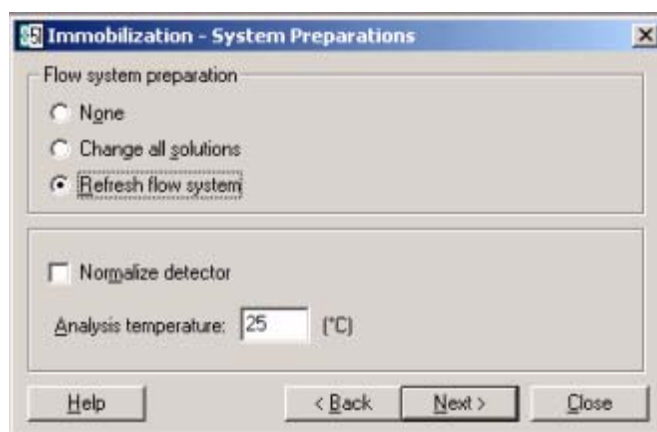
↓

Immobilization - Parameters
Flow cell 1 - spot 1
Ligand: CA
Immobilization method: Amine
Contact time: 12 (min)　Flow rate: 10 (µl/min)
Flow cell 1 - spot 2
Ligand:
Immobilization method:
Contact time: (min)　Flow rate: 10 (µl/min)
Help　< Back　Next >　Close

リガンドの添加時間（**Contact time:**）を入力し、流速（**Flow rate:**）を選択する。**Contact time:**は任意に設定できる。通常 7～15 分間。**Flow rate:**は 2, 5, 10 µ l/min の 3 種が選択可能である。通常 10 µ l/min。

設定後、**Next >**をクリックする。

↓

Immobilization - System Preparations

Flow system preparation
None
Change all solutions
Refresh flow system
Normalize detector
Analysis temperature: 25 (°C)
Help < Back Next > Close

測定前のシステム洗浄方法を選択し **Next >**クリックする。

↓

Immobilization - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (µl)	Content
R2 B1	140	EDC
R2 B2	140	NHS
R2 B3	148	CA
R2 B4	230	Ethanolamine
R2 C1	Full vial	CA coupling buffer
R2 C5	40	BIAdesorb solution 1
R2 C6	40	BIAdesorb solution 2
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

Help Menu Eject Rack < Back Start Close

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

↓

Amine coupling Fc 1 - Spot 1

Response1

Response 2

Fc	Spot	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Ligand	LigandVol	LigandFlow
1	1	Amine_Spot1	71.0	29491.2	-0.18	Yes	0	Baseline	CA	120	10
1	1	Amine_Spot1	834.0	29711.5	-0.06	No	220.3	Activation	CA	120	10
1	1	Amine_Spot1	1632.0	34276.9	-1.45	No	4785.7	Ligand	CA	120	10
1	1	Amine_Spot1	2167.0	33042.8	-0.05	No	3551.6	Immobilized	CA	120	10

2231.0 s 33040.7 RU　Not connected to instrument

固定化終了後にレポートが表示される。

immob of CA - Results

Sensor chip: CM5

Flow cell: 1

Spot 1

Ligand: CA

Method: Amine - Contact time 12.0 min, flow 10 µl/min

Response 1 (bound): 4565.4

Response 2 (final): 3551.6

Help　Print...　Chip Properties...　Close

Response1(bound)　：リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差（RU）

Response2(final)　：固定化前後のセンサーグラムの高さの差（RU）

固定化量は **Response2(final)** で評価する。

3. アナライトとの相互作用測定

（アナライト）
リガンドを固定化したセンサーチップに対して結合を測定する分子を「アナライト」と言う。

（アナライトとの相互作用測定時に準備するもの）

●ランニング緩衝液

予め相互作用測定に使用する濃度のアナライトが十分溶解可能なランニング衝液を使用する。溶解の目的で、DMSO を添加する。DMSO は様々なグレードが市販されているが、DMSO 溶液中の成分が測定に影響を及ぼすことがあるため、UV spectrometry 用等の精製度の高いグレードの使用を推奨する。ランニング緩衝液として使用可能な DMSO 濃度は 10%以下である。DMSO を加えた後、ランニング緩衝液の pH が変化することがあるため、DMSO 混合後の pH に注意が必要である。イオン強度は、センサーチップ表面への非特異的吸着を抑えるために、生理的条件（150mM NaCl）もしくは、それに近い条件が好ましい。Hepes は、ヒト血清アルブミンへ（HSA）の結合が見られるので、リガンドがヒト血清アルブミン（HSA）の場合は、Hepes ベースの緩衝液の使用は避ける。
◇ DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、テフロン製もしくはナイロン製のフィルターを用いる。酢酸セルロース製のものは避ける。
◇ 装置にセットする直前に必ず脱気を行う。

●アナライト

溶解液は、完全にランニング緩衝液に揃えたもの。

●溶媒補正用 DMSO 溶液

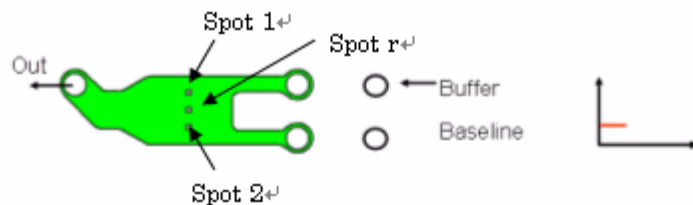
32 ページ参照

●50% DMSO

ニードル、流路の洗浄液。フローセル内には流れ込まない。

（アナライトのフローセルへの流れ方とセンサーグラム）

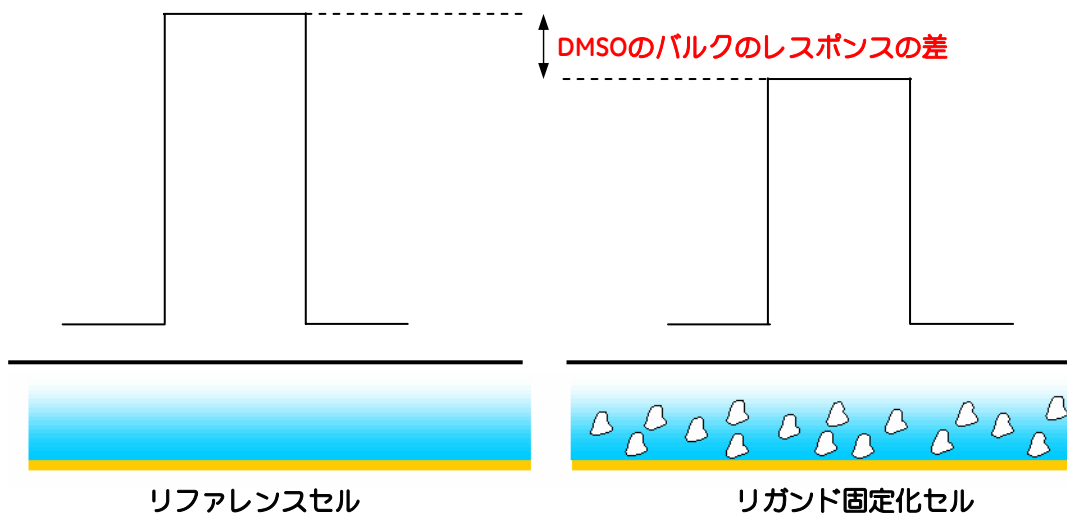
測定を開始すると 1 つのフローセルの全スポットにランニング緩衝液が流れる。

↓

アナライトを添加すると全スポットに流れる。リガンドに結合すればレスポンスが増加する。この領域を結合領域という。

↓

添加が終了すると、瞬時にランニング緩衝液に切り替わる。結合していたアナライトが解離することによりレスポンスが減少する。この領域を解離領域という。

（溶媒補正）

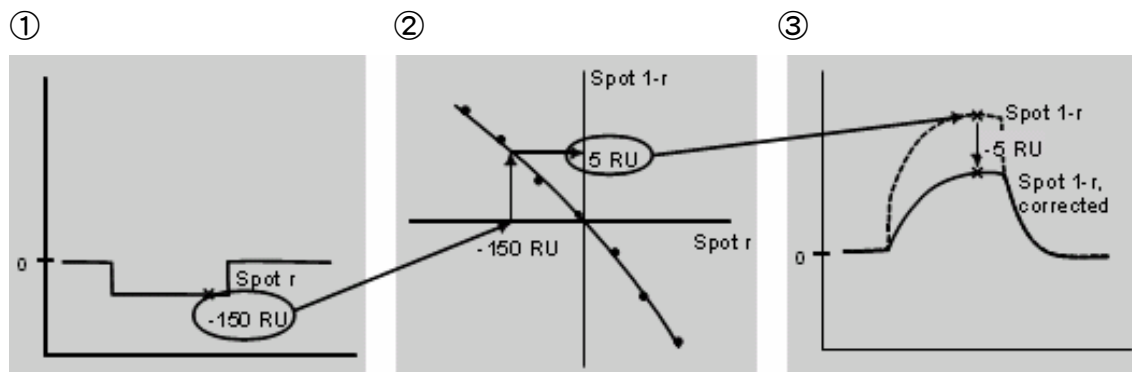
センサーグラムは、センサー表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の密度の差、溶媒効果（溶媒効果により発生するレスポンスをバルクレスポンスという。）も含む。溶媒効果が小さい（100RU以下）実験では、リガンド固定化スポットからリファレンススポットのセンサーグラムを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できる。しかし、このバルクレスポンスが十分に排除できない実験系がある。溶媒効果が大きい DMSO 混合緩衝液（ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いはバルクレスポンスの約 1200RU 程度に相当する。）を用いる実験、またリガンドの固定化量が多い実験の場合などである。リガンド固定化スポットは、リファレンススポットより、リガンド分子の占有体積分だけ、溶液が排除されるため（下図）、リファレンススポットのバルクレスポンスは、リガンド固定化スポットよりも大きくなるからである。実際、このバルクレスポンスの差は小さい（通常 10RU 以下）が、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスはこれと同程度であるため、この差を無視することはできない。

タンパク質-低分子化合物の実験では、タンパク質を高密度に固定化し、相互作用測定時に DMSO 含有緩衝液を用いることが多い。また、複数あるサンプルを個々に調製する際の DMSO 濃度に若干の差が発生するため、必ず溶媒補正が必要である。

●補正の手順

① DMSO 溶液の濃度系列を調製し、リガンド固定化スポットおよびリファレンススポットに添加する。

② 添加前後のリファレンススポットのバルクレスポンスに対してスポット間のバルクレスポンスの差をプロットし、検量線を作成する。

③ アナライトを添加した際に得られるリファレンススポットのレスポンスを検量線に当てはめ、補正値を算出し、結合レスポンスから補正値を差し引く。

①　②　③

●溶媒補正用 DMSO 溶液の調製

以下に示す溶媒補正用 DMSO 溶液の調製法は、5% DMSO 存在下で実験を行う場合のものである。他の DMSO 濃度を使う場合は、その濃度に適した濃度範囲(±1%以内)の DMSO 溶液を使用する。すべての DMSO 溶液は用事調製する。

1. DMSO を含まないランニング緩衝液を準備する。
2. 検量線用 4%、6% DMSO ストック溶液を調製する。

4% DMSO ストック溶液	ランニング緩衝液	9600 μl
	100% DMSO	400 μl
		10000 μl

6% DMSO ストック溶液	ランニング緩衝液	9400 μl
	100% DMSO	600 μl
		10000 μl

3. 上記検量線用ストック溶液を下記表の割合で混合し、4%～6%の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する。以下の表は 8 段階の溶媒補正溶液を調製する際のプロトコールである。（単位；μl）

4%	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
6%	1400	1200	1000	800	600	400	200	
	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400

（注）DMSO はプラスチック容器に保存しないこと。DMSO を含む溶液を取り扱う際に使用するプラスチック製品は DMSO 耐性品であることを確認する。DMSO を含む溶液をろ過する際には、テフロン製もしくはナイロン製の膜を使用する。酢酸セルロース製の膜は使用しないこと。

(相互作用測定の流れ)

操作内容	Wizard 名
①ランニング緩衝液の交換	→**Change All Solutions**
(②ポジティブコントロールサンプルの結合の確認	→**Binding Conditions**)
③溶媒補正用 DMSO 溶液の調製確認	→**Interactive Run**
④スクリーニング	→**Hit Selection**
または	
解離定数、反応速度定数の算出	→**Compound Characterization**

① 固定化終了後、相互作用測定用ランニング緩衝液に **Change All Solutions** にてシステム内を置換する。
② ポジティブコントロールサンプルがあれば **Binding Conditions** で結合の確認を行う。ここで固定化したリガンドの活性チェックやアナライトスクリーニング時に使用する濃度の検討を行う。
③ 結合化合物のスクリーニングや解離定数、反応速度定数の算出時に使用する溶媒補正用 DMSO 溶液のチェックを **Interactive Run** を用いて行う。
④ 実験目的がスクリーニングの場合、**Hit Selection** で結合するアナライトを探索する。アナライトの解離定数や反応速度定数の算出等、少数のアナライトを詳細に評価する場合には **Compound Characterization** を用いる。

3-1. 相互作用測定の前準備

3-1-1. 相互作用測定用ランニング緩衝液への交換（Change All Solutions）

Standby 状態になっている場合は、一度送液を停止し、ランニング緩衝液のボトルを置換する。

ランニング緩衝液をセットし、**Tools** → **Change All Solutions...**を選択する。

Biacore S51 Control Software on COM1
File Edit View Run Tools Window Help
Evaluation Ctrl+E
Dilution Calculator...
Change All Solutions...
Shutdown...
Standby...
Stop Standby
Eject Rack...
Eject Chip...
Set Temperature...
Preferences...
More Tools... Ctrl+T

↓

Change All Solutions
Place the solutions in the reagent compartment and insert the inlet tubings.
< Back Start Close

Start をクリックする。

↓

Change All Solutions
The Change All Solutions procedure is completed.
< Back Next > Close

約 4 分 30 秒後、終了したことを知らせるウィンドウが表示される。**Close** をクリックする。
装置は Standby flow の状態になる。

3-1-2.　結合の確認実験（Binding Conditions）

固定化したリガンドに対して、2 濃度のポジティブコントロールサンプルの結合レスポンスを確認することにより、固定化したリガンドの活性チェックと候補化合物絞り込みの際に使用するアナライト濃度の検討を行う。

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリックする。

Run Wizard

- Surface Preparation
  - Immobilization
  - Immobilization pH Scouting
- Assay Development
  - Interactive Run
  - Binding Conditions
  - Regeneration Conditions
  - Pilot Run
- Assays
  - Hit Selection
  - Compound Characterization

Tests binding of analyte to the surface at two different concentrations per analysis cycle. Additional cycles can be added within the same run. Use this wizard to test surface activity and get a first estimate of the analyte binding characteristics.

Help　Use Template...　Start...　Cancel

↓

Start...をクリックする。

↓

Binding Conditions - Setup

Detection
Flow cell: 1　Spot: 1

Flow rate
Flow rate: 30 (µl/min)

Sample
Name: Furosemide
Contact time: 60 (s)　Dissociation time: 300 (s)
Concentration, first injection: 10 µM
Concentration, second injection: 50 µM

Help　Chip Properties...　< Back　Next >　Close

各種測定項目の詳細設定	
(Detection)	
Flow cell	検出フローセルの選択
Spot	検出スポットの選択
(Flow rate)	
Flow rate	流速の選択 (10, 30, 90 μl /min の選択が可能、通常 30 μl /min)
(Sample)	
Name	ポジティブコントロールサンプル名を入力
Contact time	添加時間の入力（通常 60 秒）
Dissociation time	解離時間の入力（通常 300 秒）
Concentration, first injection	濃度の入力と単位の選択
Concentration, second injection	濃度は 10 と 50 を入力、単位 μM を選択する。 （注）リガンドに対するポジティブコントロールサンプルの K_D 値がわかっている場合は、その K_D 値付近~10 倍程度高めの濃度を用いる。親和性が強いことが予測される場合は、0.1 と 1 μM 等の低濃度を用いても良い。

設定後、**Next >**をクリックする。

↓

Binding Conditions - System Preparations

Flow system preparation
- None
- Change all solutions
- Refresh flow system

Normalize detector

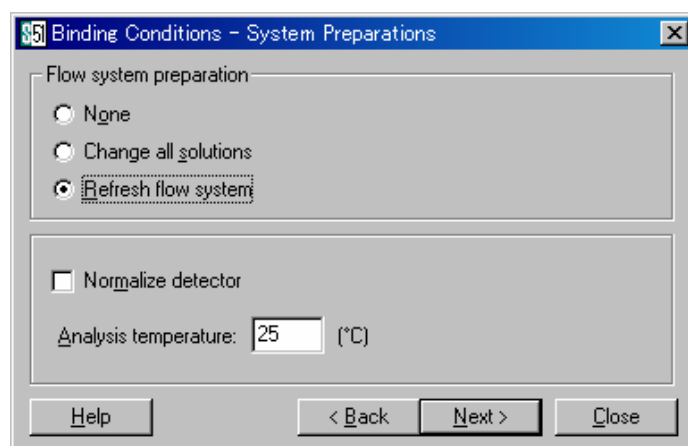
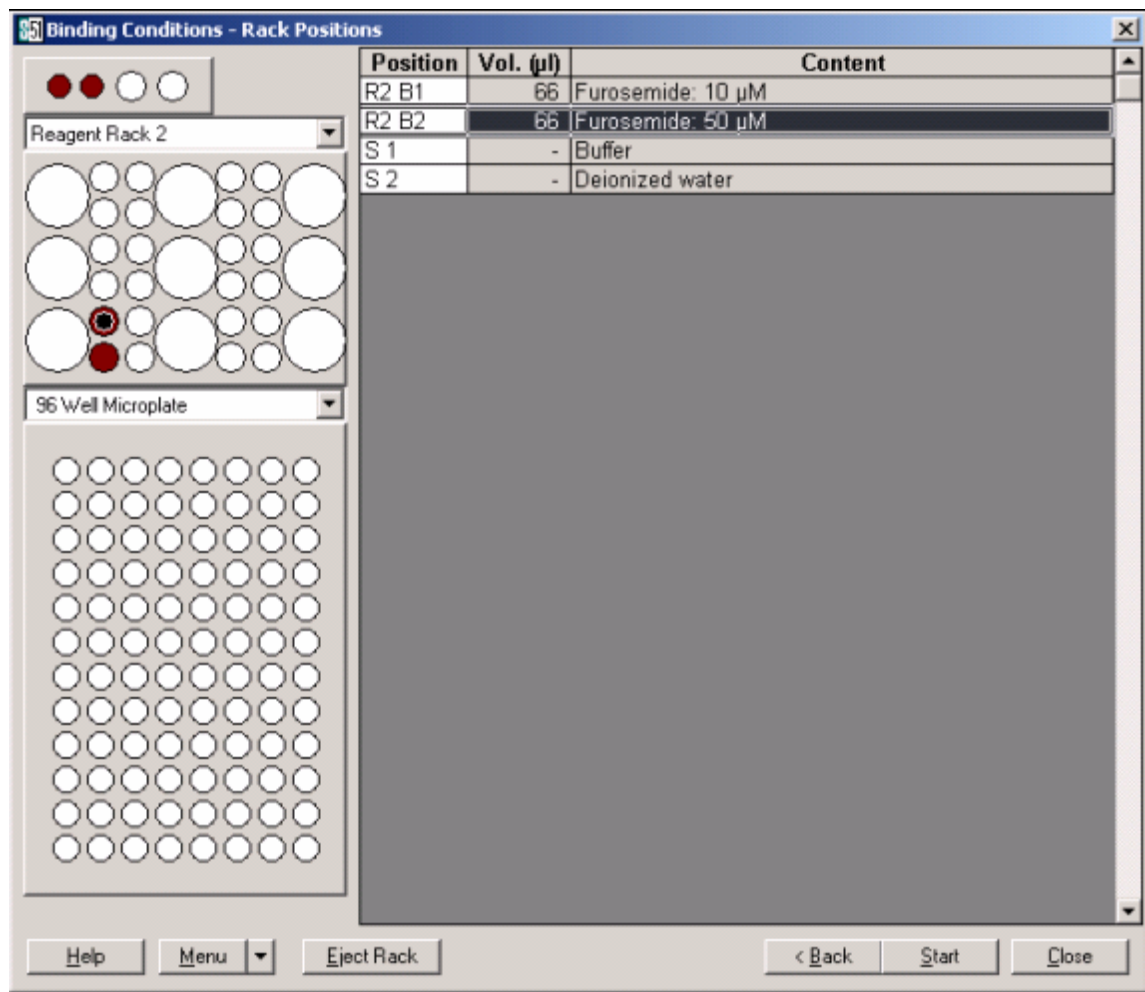
Analysis temperature: 25 (°C)

Help | < Back | Next > | Close

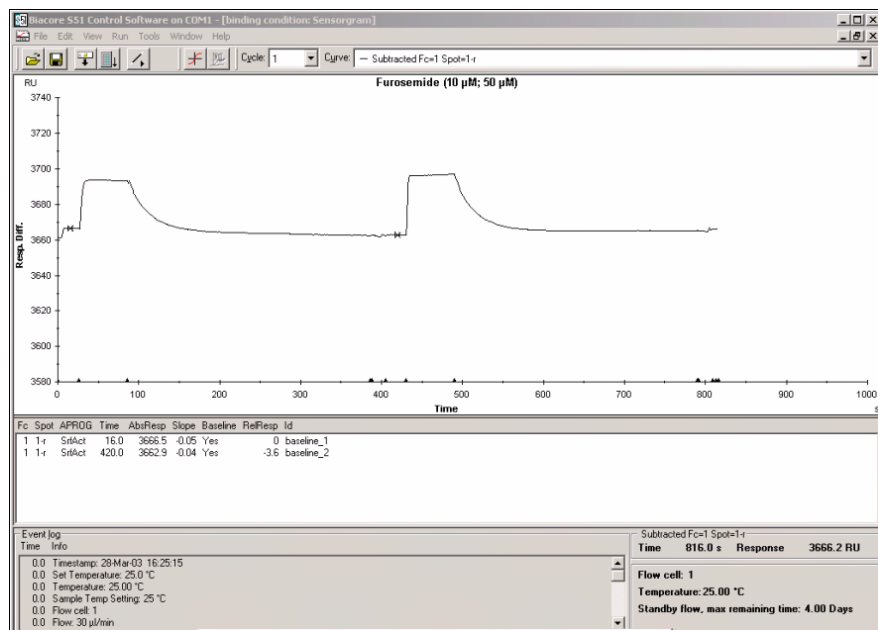
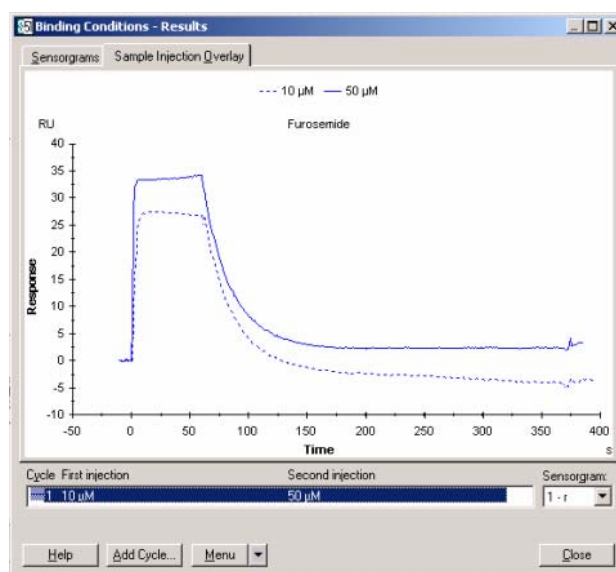
実行前のシステム洗浄方法を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

Binding Conditions - Rack Positions

Position	Vol. (µl)	Content
R2 B1	66	Furosemide: 10 µM
R2 B2	66	Furosemide: 50 µM
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

↓

↓

2 濃度の測定結果が重ね書きされる。

（結果の評価）

●予想される K_D 値に対し十分な濃度を使用しても結合レスポンスを確認することができない場合は、固定化したリガンドの活性に問題があることが考えられる。固定化条件を検討しなおす必要がある。

●2 濃度のレスポンスが重なっている場合は、使用した低濃度において、すでに Rmax 値であることが考えられる。候補化合物の絞り込みの際に、このサンプルをコントロールサンプルとして使用する場合の濃度は、低濃度で十分である。

●候補化合物の絞り込みの際のアナライト添加条件（結合、解離時間（sec））や再生の必要性を考察する。

3-1-3. 溶媒補正用 DMSO 溶液のチェック（Interactive Run）

溶媒補正用の DMSO 溶液の調製に間違いがないか確認を行う。溶媒補正で使用する DMSO 補正溶液の最低濃度と最高濃度について測定する。測定したバルクレスポンスに注目し、リファレンスセルのバルクレスポンスが広い範囲（-500～1500RU 以上）をカバーしていることを確認する。

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリックする。

Run Wizard から **Interactive Run** を選択し **Start...**をクリックする。

Run Wizard

Surface Preparation
Immobilization
Immobilization pH Scouting
Assay Development
Interactive Run
Binding Conditions
Regeneration Conditions
Pilot Run
Assays
Hit Selection
Compound Characterization

Enables user-specified injection of samples over the surface. Use this wizard for exploratory tests such as checking the range of the solvent correction solutions.

NOTE: Templates for Interactive Run cannot be saved.

Help | Use Template... | Start... | Cancel

↓

Interactive Run - Setup

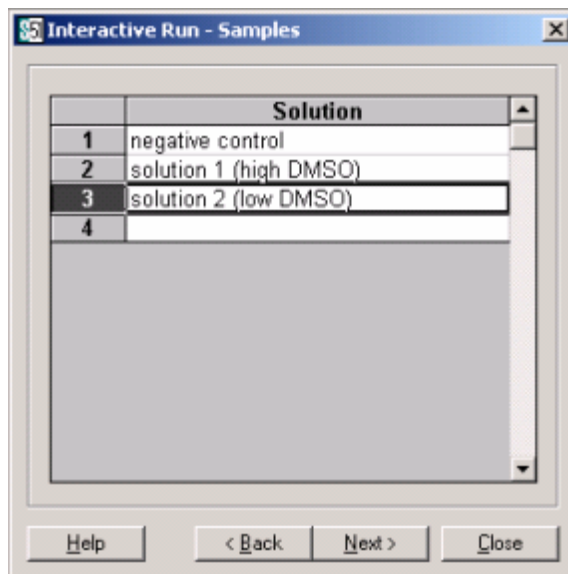
Flow
Flow rate: 30 (µl/min)

Detection
Flow cell: 1 Spot: 1

Help | < Back | Next > | Close

Flow rate:は 30 µｌ/min に設定する。使用する **Flow cell:**とリガンド固定化 **Spot** を選択後、**Next >**をクリックする。

↓

添加する溶液名を入力する。

ここではネガティブコントロールとして 5% DMSO ランニング緩衝液、solution 1 として high DMSO (6% DMSO)、solution 2 として low DMSO (4% DMSO)を入力した。

入力後 **Next >**をクリックする。

↓

実行前のシステム洗浄方法を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

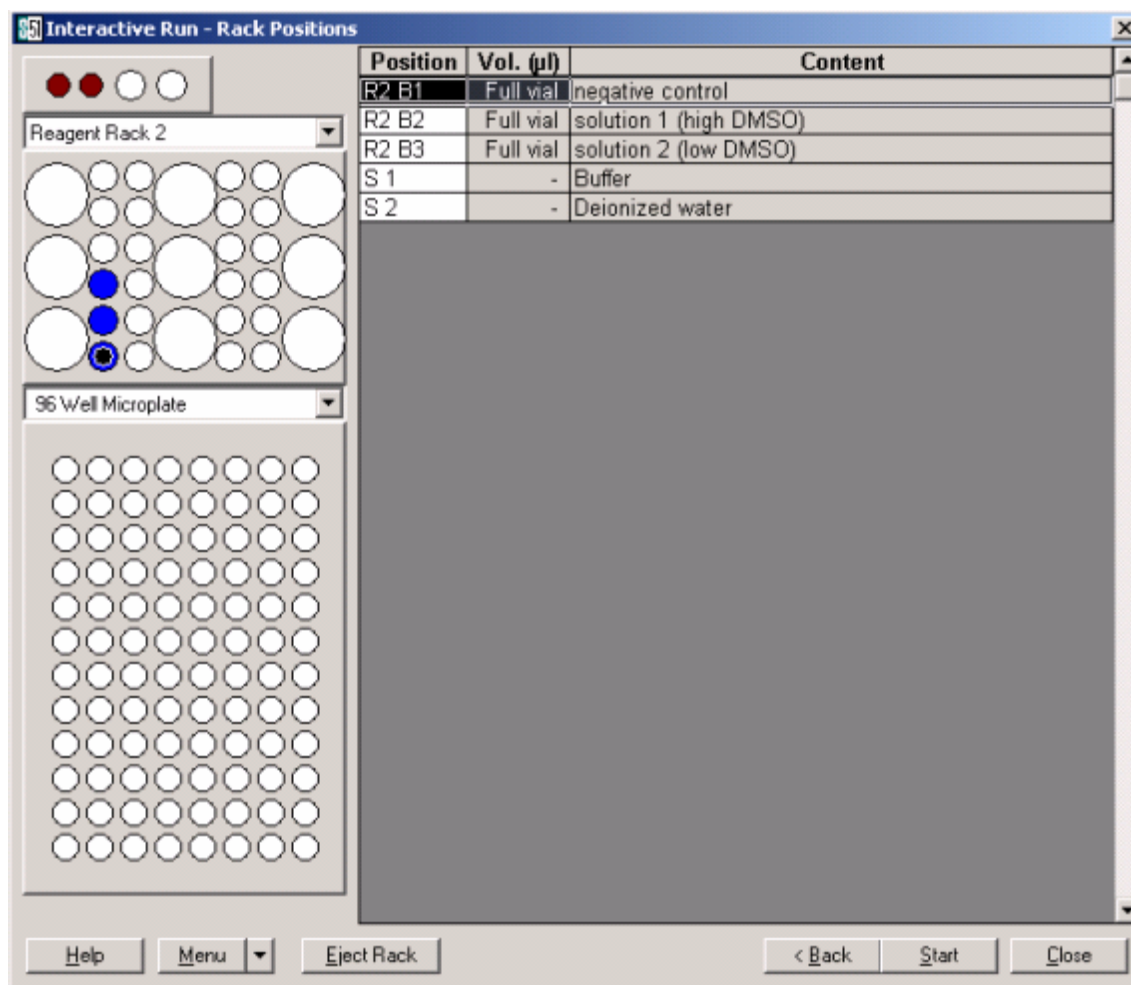
ラックポジションの設定ウィンドウが表示される。

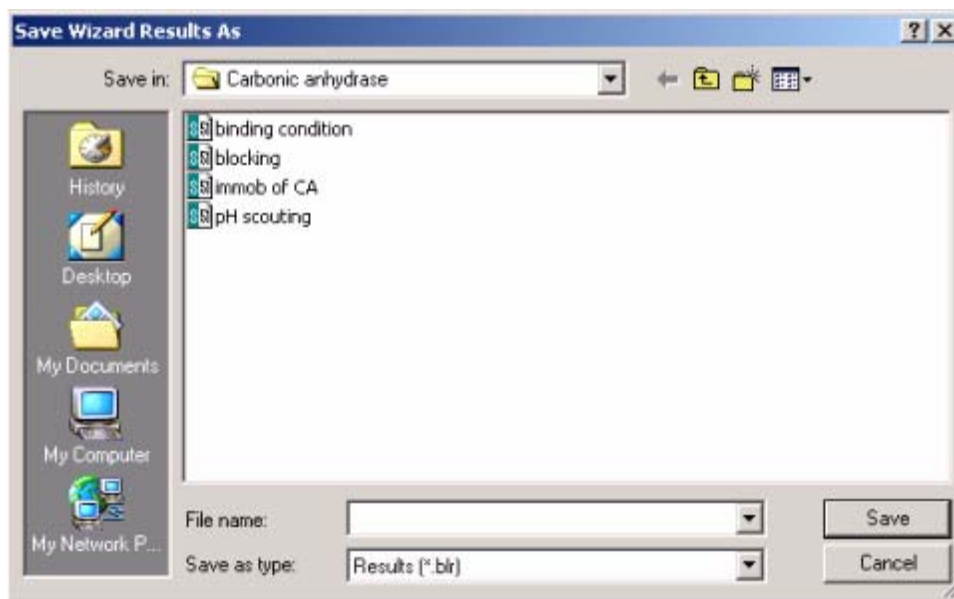
Interactive Run - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (µl)	Content
R2 B1	Full vial	negative control
R2 B2	Full vial	solution 1 (high DMSO)
R2 B3	Full vial	solution 2 (low DMSO)
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

Help Menu Eject Rack < Back Start Close

確認後 **Start** をクリックする。

↓

保存先を選択し、**File name:**を入力後、**Save** をクリックすると測定がスタートする。

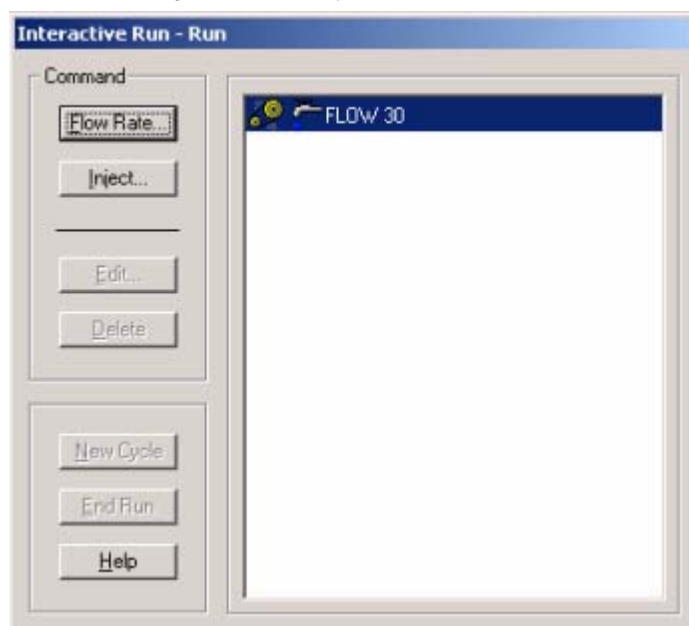
↓

Interactive Run の wizard が表示される。

Inject...をクリックする。

↓

Interactive Run - Inject

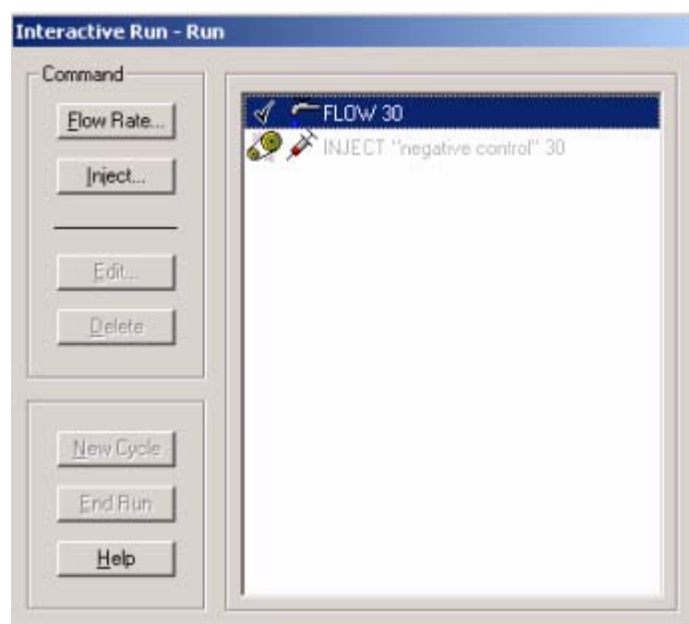
Solution: negative control
Volume: 30 (µl) Contact time: 60 (s)
Help OK Cancel

Inject ウィンドウの **Solution:**から添加する溶液を選択する。**Volume** に 30μl を入力し、60 秒間添加する。

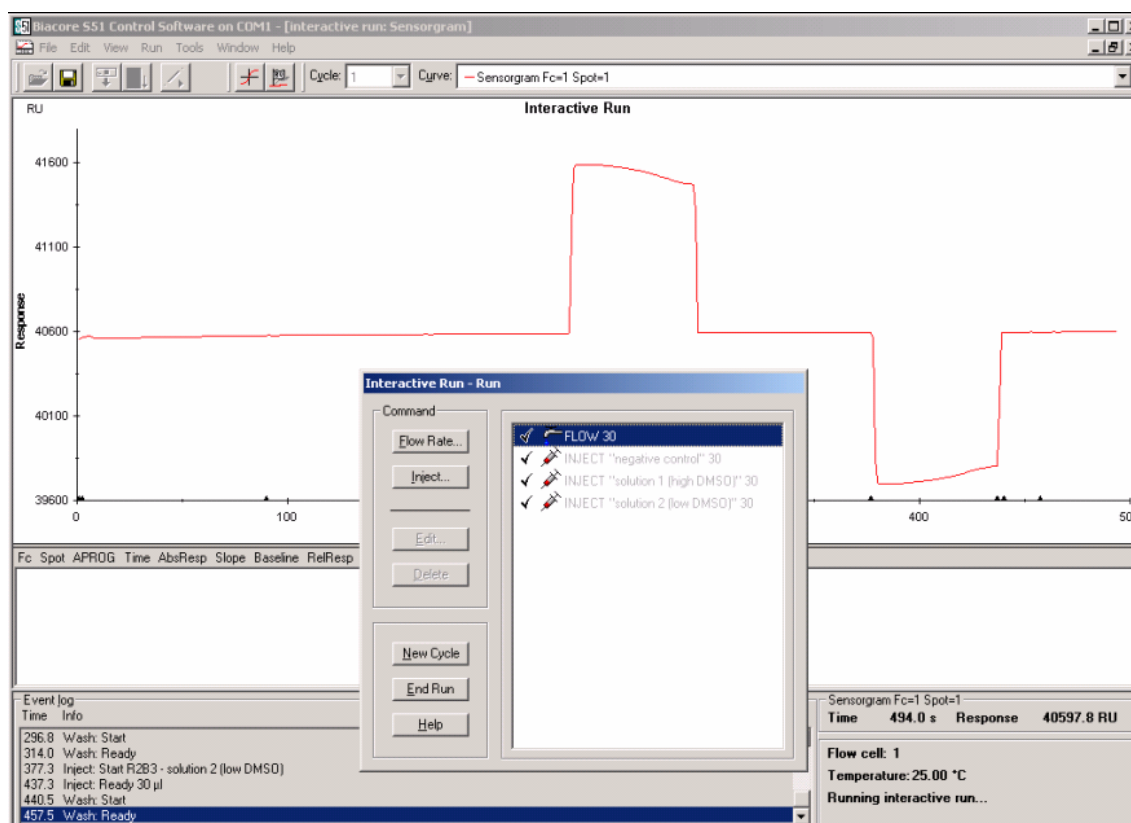
↓

Interactive Run - Run

Command
Flow Rate...
Inject...
Edit...
Delete
New Cycle
End Run
Help

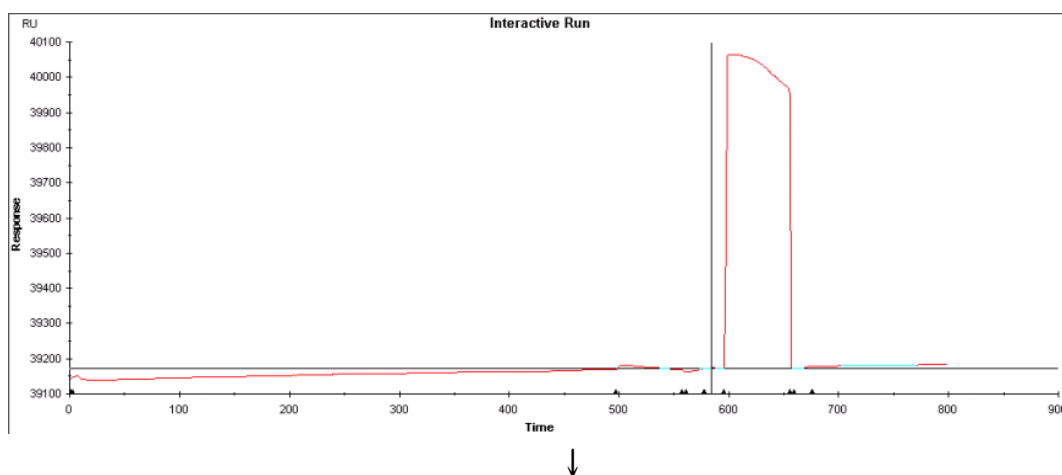
FLOW 30
INJECT "negative control" 30

↓

引き続き、他の溶液に関しても添加する。

↓

添加終了後、End Run をクリックし、測定を終了する。

ランニング緩衝液に対する各溶媒補正用の DMSO 溶液のバルクレスポンスの高さを測定し、調製具合を評価する。

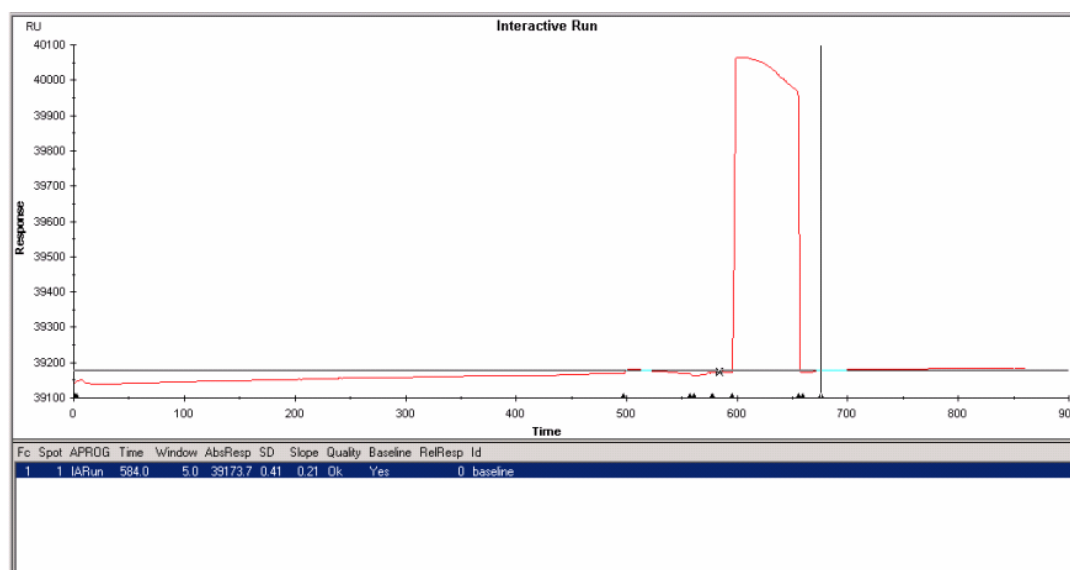
Tool bar の あるいは **View** → **Reference line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。

↓

カーソルを、センサーグラム上の溶媒補正用の DMSO 溶液添加前の位置でクリックし、リファレンスラインを移動させる。

↓

Tool bar の あるいは **Edit** → **Add Report Point** をクリックする。

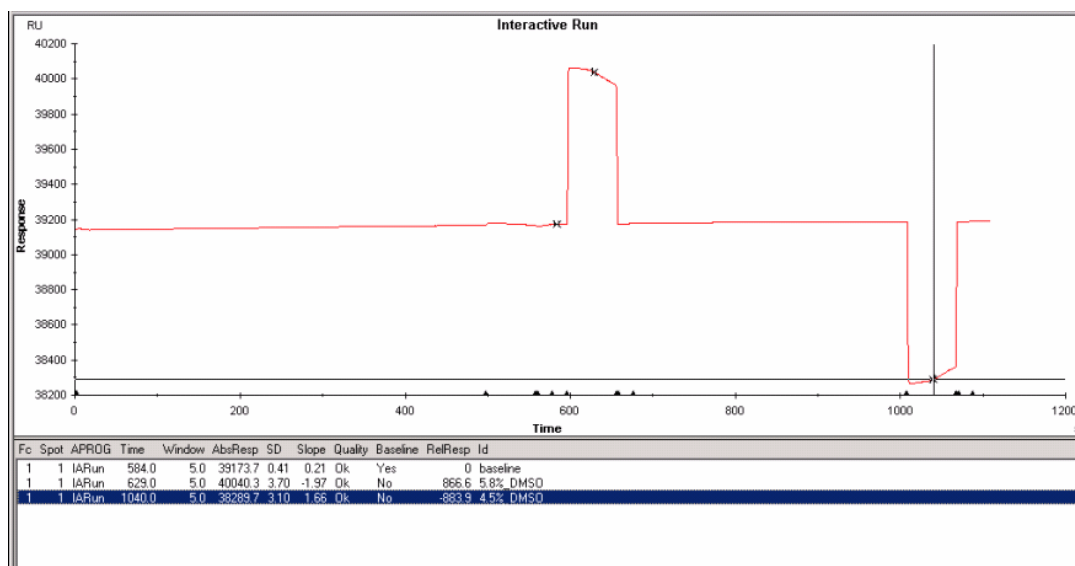
Id:の欄にコメントを入力し、**Baseline** にチックを入れ、**OK** をクリックする。

↓

レポートポイントテーブル中の相対値（RelResp）の値は 0 になる。

↓

引き続き、リファレンスラインを溶媒補正用の DMSO 溶液添加中の位置でクリックし、同様にレポートポイントを取る。

↓

Fc	Spot	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	1	IARun	584.0	5.0	39173.7	0.41	0.21	Ok	Yes	0	baseline
1	1	IARun	629.0	5.0	40040.3	3.70	-1.97	Ok	No	866.6	5.8%_DMSO
1	1	IARun	1040.0	5.0	38289.7	3.10	1.66	Ok	No	-883.9	4.5%_DMSO

Baseline からの相対値(RelResp)が表示される。

↓

レポートポイントを取り終わったら Tool bar のあるいは **View → Reference line** をクリックし、センサーグラムウィンドウからリファレンスラインを消去する。

（結果の評価）

1%の DMSO 濃度の違いが約±1,200RU に相当する。各溶媒補正用の DMSO 溶液のバルクレスポンスは、アナライト調製誤差を考慮し、少なくとも±500RU 以上の幅を確保するのが望ましい。確保できていない場合は、溶媒補正用の DMSO 溶液を調製しなおすか、ランニング緩衝液の DMSO 濃度を再確認し、必要に応じて調製しなおす。

3-2. スクリーニング（Hit Selection）

リガンドに対して結合するアナライトをスクリーニングするための wizard である。結合の有無、アナライトを同濃度でスクリーニングすれば、さらに結合する化合物の結合の強さ、速さの順位付け（ランキング）を行うことができる。

3-2-1. 測定プログラムの作成

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリック。

Run Wizard
Surface Preparation
Immobilization
Immobilization pH Scouting
Assay Development
Interactive Run
Binding Conditions
Regeneration Conditions
Pilot Run
Assays
Hit Selection
Compound Characterization
Performs routine analyte binding assays for samples in 96- or 384-well microplates, including positive and negative controls and repeated solvent correction cycles. Use this wizard for secondary screening, early ADME and other protein binding assays.
Help Use Template... Start... Cancel

Hit Selection を選択し **Start...**をクリックする。

↓

Hit Selection - Assay Format
Direct binding
Surface competition
Help < Back Next > Close

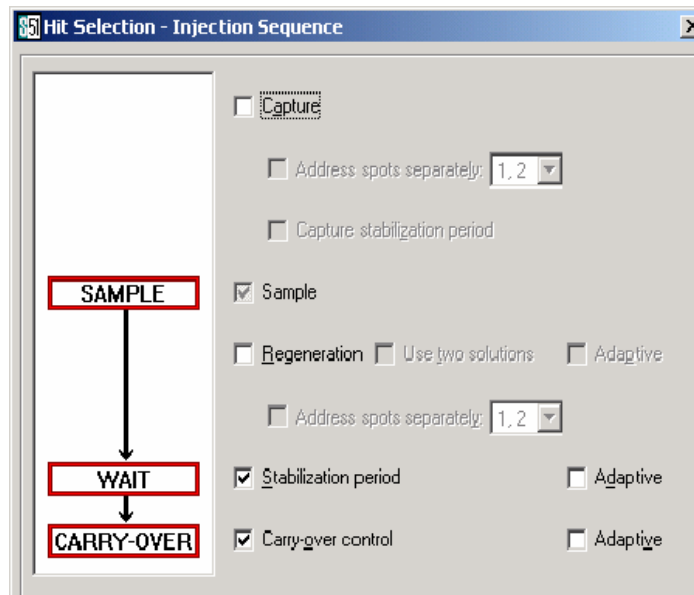
Direct binding は、固定化したリガンドに対して結合するアナライトをスクリーニングする際に選択し、**Surface competition** は、固定化したリガンドとポジティブコントロールサンプルの結合を阻害、もしくは並行して結合するアナライトをスクリーニングする際に使用する。Surface competition で、結合阻害するアナライトをスクリーニングする際は、ポジティブコントロールサンプルの分子量と異なる分子量のアナライトを使用する。

Direct binding にチェックを入れ、Next >をクリックする。

↓

Hit Selection - Injection Sequence

SAMPLE
WAIT
CARRY-OVER

Capture
Address spots separately: 1, 2
Capture stabilization period
Sample
Regeneration　Use two solutions　Adaptive
Address spots separately: 1, 2
Stabilization period　Adaptive
Carry-over control　Adaptive

測定シークエンスの項目	
Capture	リガンドの添加 リガンドをセンサーチップ表面に固定化したキャプチャー分子（抗体など）で親和性を利用してトラップする際に使用する。
Sample	アナライトの添加（選択不可能）
Regeneration	再生溶液の添加 毎サイクルごとアナライトを強制的に溶出させる場合に使用する。リガンドをキャプチャー法によりトラップしている場合は、リガンドごと溶出する。キャプチャー分子からリガンドを解離させる溶液を添加する。
Stabilization period	再生溶液添加終了後の待ち時間、安定化時間 再生溶液添加終了後、ベースラインがアナライト添加前の高さに戻るのに時間を要する場合に使用する。
Carry-over control	ランニング緩衝液の添加 次のサイクルへのアナライトのキャリーオーバー（ニードル、流路系への吸着の有無）の確認。再生を行わない場合は、実施するのが望ましい。

必要項目を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

次に測定項目の詳細設定を行う。

Hit Selection - Assay Setup

Detection
Flow cell: 1 Spot: 1, 2 Reference spot during run: r

Flow rate
Flow rate: 30 (µl/min)

Conditioning
Run sensor chip conditioning
Conditioning solution: 10mM NaOH
Contact time: 30 (s) Number of injections: 3
Run startup cycles
Sample solution: buffer
Number of cycles: 5

Solvent correction
Run solvent correction cycles
Run correction cycle every 20 sample cycles
Number of correction points: 8

Help | Chip Properties... | < Back | Next > | Close

各種測定項目の詳細設定内容

（Detection）

Flow cell 検出フローセルの選択

Spot 検出スポットの選択

Reference spot during run リファレンスセルの選択

（Flow rate）

Flow rate 流速の選択

（Conditioning）

Run sensor chip conditioning

物理吸着等でセンサーチップ表面に結合しているリガンドを洗い流す操作である。測定時のベースラインの低下を抑制することができる。酸、アルカリなどの再生溶液を添加することが多いが、リガンドの安定性を第一に考慮する。リガンドの耐性が不明であれば実施しない。

Conditioning solution 再生溶液の入力

Contact time 接触時間の入力

Number of injections 添加回数の入力

Run startup cycles 測定の前にランニング緩衝液、もしくはポジティブコントロールサンプルを用いてダミーランを実施する操作。アナライト測定と同様のプログラムである。この操作は必ず行う。

Sample solution サンプル（通常ランニング緩衝液）の入力

Number of cycles 添加回数の入力（3 回以上設定する。）

（Solvent correction）

Run solvent correction cycles

溶媒補正に関する情報入力

Run correction cycle every__sample cycles

補正を行う頻度を入力（標準は 20 サンプルごと）

Number of correction points

一本の溶媒補正曲線内のポイント数の入力

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

アナライトの添加に関する詳細設定を行う。

Hit Selection - Injection Parameters
Sample injection
Contact time: 60 (s) Dissociation time: 300 (s)
Extra wash after injection with: 50% DMSO
Duplicate samples:
Stabilization period
Stabilization time: 30 (s)
Help < Back Next > Close

アナライト添加条件の詳細設定内容	
(Sample injection)	
Contact time	添加時間の入力
Dissociation time	解離時間の入力
Extra wash after injection with	
	アナライト添加後にニードルを指定した試薬で洗浄する操作。通常 50% DMSO を使用する。
Duplicate samples:	1 サンプルを 2 回ずつ測定する場合に設定する。チェック後、右のセレクションツールで測定順序を選択する。"**Same well, custom order**"は同一ポジションのアナライトを任意の順序で測定、"**Same well, consecutive cycles**"は同一ポジションのアナライトを連続して測定する意味である。
(Stabilization period)	
Stabilization time	設定時間の入力(30〜120 秒程度) 測定シークエンスで **Stabilization period** を選択している場合に表示される。再生を行わない場合は使用せず、アナライト添加時の解離時間で調整することが多い。

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

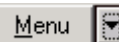
Hit Selection - Sample Table

	Sample	Position	MW (Da)	Conc. µM	Conc. µg/ml
1	Digitoxin	R1A1	765	50	38.25
2	Warfarin	R1A2	308	50	15.4
3	Napoxen	R1A3	230	50	11.5
4	Phenytoin	R1A4	252	50	12.6
5	Sulfanilamide	R1A5	172	50	8.6
6	CBSA	R1A6	201	50	10.05
7	Furosemide	R1A7	543	50	27.15
8	Azosulfamide	R1A8	331	50	16.55
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

Sample microplate type: 96 Well Microplate　Sample positioning: Manual
Reagent rack type: Reagent Rack 2
Help　Menu　< Back　Next >　Close

測定するアナライトの名前、（位置、）分子量、濃度を入力する。

アナライトのポジショニング

アナライトの設置位置は、マニュアルで入力することもできるが、 Menu

Sample Positioning…
Import Sample Data
Add/Edit User Defined Columns…
Delete Selected Sample(s)
Insert Sample(s)

の **Sample Positioning…**から自動的に入力することも可能である。

Hit Selection - Sample Positioning
Sample positioning
Manual
Automatic vertical
Automatic horizontal
Help　OK　Cancel

デフォルトは **Manual**　**Automatic vertical**　**Automatic horizontal**

設定後、Next >をクリックする。

↓

ポジティブコントロールサンプルの添加に関する詳細設定を行う。
（コントロールサンプルがなければ、空白のまま Next >をクリックする。）

Hit Selection - Control Sample Table

	Control Sample	MW (Da)	Conc. µM	Conc. µg/ml	#Cycles	Freq.
1	Negative control		0		2	8
2	Control Furosemide	543	50	27.15	2	8
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Help Menu < Back Next > Close

#Cycles 全測定サイクル中の総測定回数の入力
Freq. 測定頻度（何サンプルごとか）の入力
（#Cycle、Freq のいずれか片方を入力すると、自動的にもう片方が計算される。）

設定後 Next >をクリックする。

↓

Hit Selection - Cycle Editor

Cycle	Repl.	MW (Da)	Conc. (µM)
1 - Startup Cycle	1		
2 - Startup Cycle	1		
3 - Startup Cycle	1		
4 - Startup Cycle	1		
5 - Startup Cycle	1		
6 - Solvent Correction	1		
7 - Negative control	1		0
8 - Control Furosemide	1	543	50
9 - Digitoxin	1	765	50
10 - Warfarin	1	308	50
11 - Napoxen	1	230	50
12 - Phenytoin	1	252	50
13 - Sulfanilamide	1	172	50
14 - CBSA	1	201	50
15 - Furosemide	1	543	50
16 - Azosulfamide	1	331	50
17 - Negative control	1		0
18 - Control Furosemide	1	543	50

Sample order: As entered / Randomized / Custom
Move cycle: Up / Down
Help Menu < Back Next > Close

×	：スタートアップサイクル
	：溶媒補正
◆	：コントロールサンプル
◇	：アナライト

測定順序を選択する。
（Sample order）

As entered 入力順に測定
Randomized ランダムに測定

設定後、**Next >**をクリックする。

↓

Hit Selection - System Preparations

Flow system preparation

None

Change all solutions

Refresh flow system

Normalize detector

Analysis temperature: 25 (°C)

Help < Back Next > Close

実行前のシステム洗浄方法を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

Hit Selection - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (µl)	Content
R1 A2	66	Warfarin - 50 µM
R1 A3	66	Napoxen - 50 µM
R1 A4	66	Phenytoin - 50 µM
R1 A5	66	Sulfanilamide - 50 µM
R1 A6	66	CBSA - 50 µM
R1 A7	66	Furosemide - 50 µM
R1 A8	66	Azosulfamide - 50 µM
R1 A9	66	Control - Negative control - 0 µM
R1 A10	66	Control - Negative control - 0 µM
R1 A11	66	Control - Control Furosemide - 50 µM
R1 A12	66	Control - Control Furosemide - 50 µM
R2 B1	Full vial	Solvent correction solution 1 (predip)
R2 B2	Full vial	Solvent correction solution 1
R2 B3	Full vial	Solvent correction solution 2 (predip)
R2 B4	Full vial	Solvent correction solution 2
R2 B5	Full vial	Solvent correction solution 3 (predip)
R2 B6	Full vial	Solvent correction solution 3
R2 C1	Full vial	Solvent correction solution 4 (predip)
R2 C2	Full vial	Solvent correction solution 4
R2 C3	Full vial	Solvent correction solution 5 (predip)
R2 C4	Full vial	Solvent correction solution 5
R2 C5	Full vial	Solvent correction solution 6 (predip)
R2 C6	Full vial	Solvent correction solution 6
R2 E1	Full vial	Solvent correction solution 7 (predip)
R2 E2	Full vial	Solvent correction solution 7
R2 E3	Full vial	Solvent correction solution 8 (predip)
R2 E4	Full vial	Solvent correction solution 8
R2 E5	520	50% DMSO
R2 F6	150	BIAnormalizing solution 70% (w/w) glycerol

Help Menu Eject Rack < Back Start Close

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

キャプチャー法によるリガンドのトラップ

リガンドをキャプチャー分子（抗体など）を介してセンサーチップ表面上にトラップし、相互作用測定を行う Wizard の設定法を説明する。下図はキャプチャー法を利用した相互作用測定時の測定シークエンスである。リガンドの添加に引き続き、アナライトを添加し、相互作用を観察した後に、再生溶液でリガンドごと溶出させる。サイクルごとにリガンドを添加するため、リガンド使用量は多いが、新鮮なリガンドに対して相互作用測定を行うことができ、再生によるリガンドの活性低下を懸念する必要はない。

アナライト
再生溶液
リガンド
23500
23000
22500
22000
21500
21000
20500
20000
19500
19000
18500
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

Hit Selection - Injection Sequence
CAPTURE
CAPTURE
WAIT
SAMPLE
REGEN
WAIT
Capture
Address spots separately: 1, 2
Capture stabilization period
Sample
Regeneration
Use two solutions
Address spots separately: 1, 2
Stabilization period
Help
< Back
Next >
Close

測定シークエンスウィンドウの **Capture** にチェックを入れる。

Address spots separately

リガンドをキャプチャーするスポットを選択する。スポット 1 または 2 または 1、2 より選択可能である。キャプチャー法によるリガンドのトラップを行う実験系では、通常、キャプチャー分子を両スポットに固定化し、片方のスポットに目的リガンドをトラップし、もう一方のスポットは、そのまま、もしくはネガティブリガンドをトラップして、リファレンスセルとして用いる。

Capture stabilization period

キャプチャー後にセンサーグラムの安定化時間を加える場合に使用する。

必要に応じて、設定後 **Next >** をクリックする。

↓

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定の詳細設定を行い、Wizard を進める。

↓

Hit Selection - Injection Parameters

Ligand capture, separately addressed spots

Ligand spot 1: GST fusion protein1

Contact time 1: 120 (s) Flow rate 1: 10 (µl/min)

Extra wash after injection 1

Ligand spot 2: GST fusion protein2

Contact time 2: 120 (s) Flow rate 2: 10 (µl/min)

Extra wash after injection 2

Capture stabilization time: 30 (s)

Sample injection

Contact time: 60 Dissociation time: 30 (s)

Extra wash after injection with: 50% DMSO

Duplicate samples

Regeneration

Regeneration solution: Gly-HCl pH2.0

Contact time: 30 (s) High viscosity solution

Stabilization period

Stabilization time: 30 (s)

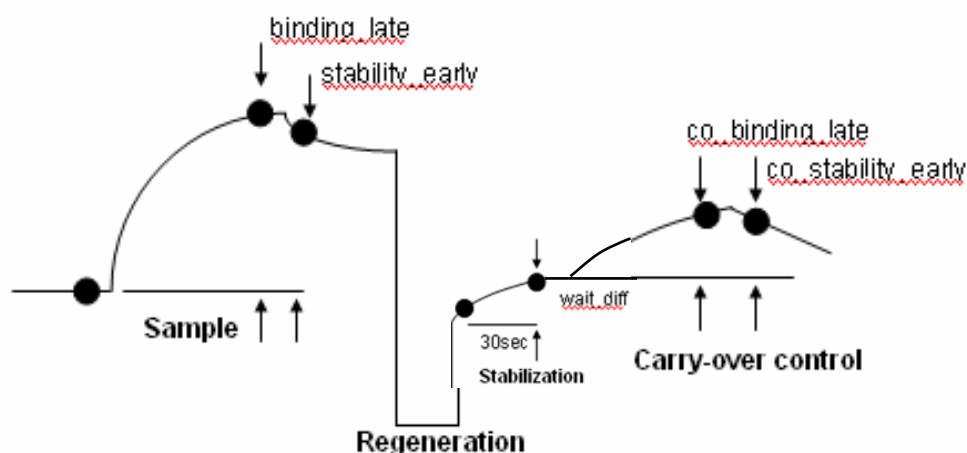
Help < Back Next > Close

必要事項を入力あるいは選択する。

↓

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

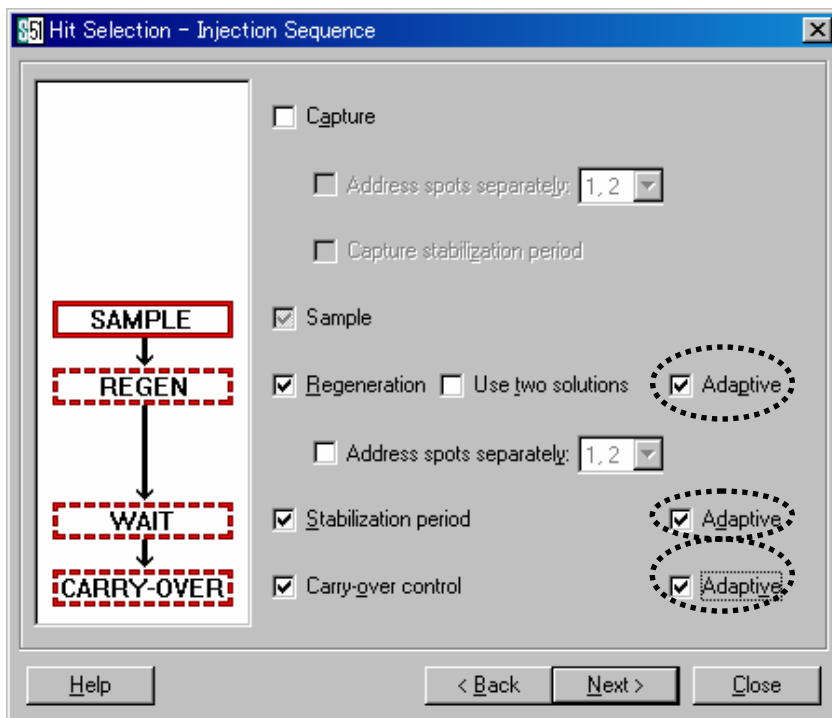
Adaptive 機能

Hit Selection では指定した範囲の結合レスポンスが得られた場合に限り再生を加えたり、キャリーオーバーチェックを行ったりという閾値の設定が可能である。
閾値の評価対象は、自動的に記録されているレポートポイント（RU）や一定時間内での変化量（RU）等である。

Regeneration の項目での Adaptive
stability_late と co_stability_late のレスポンスが設定値以上である場合に限り再生を行う。2 種類の再生溶液を使用する場合、**Use two solutions** にチェックを入れる。また、片方のスポットのみ再生操作を加える場合や、スポットごとに異なる再生溶液を使用する場合には **Address spots separately:**にチェックを入れ、スポットを選択する。

Stabilization （period）の項目での Adaptive
再生溶液添加終了後、30 秒間でのセンサーグラムの変化量（RU）を指標に、ベースラインの安定化時間を加える。

Carry-over control の項目での Adaptive
binding_late の直前、または stability_early の直後のレスポンスが設定値以上の場合にキャリーオーバーチェックを行う。またその際、co_binding_late の直前または co_stability_early の直後のレスポンスが設定値以上であった場合も再度キャリーオーバーチェックを行う。

閾値の設定は、測定シークエンスのウィンドウで行う。

Hit Selection - Injection Sequence
Capture
Address spots separately: 1, 2
Capture stabilization period
SAMPLE
REGEN
WAIT
CARRY-OVER
Sample
Regeneration
Use two solutions
Adaptive
Address spots separately: 1, 2
Stabilization period
Adaptive
Carry-over control
Adaptive
Help
< Back
Next >
Close

必要に応じて、Adaptive にチェック後 **Next >**をクリックする。

↓

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定の詳細設定を行い、Wizard を進める。

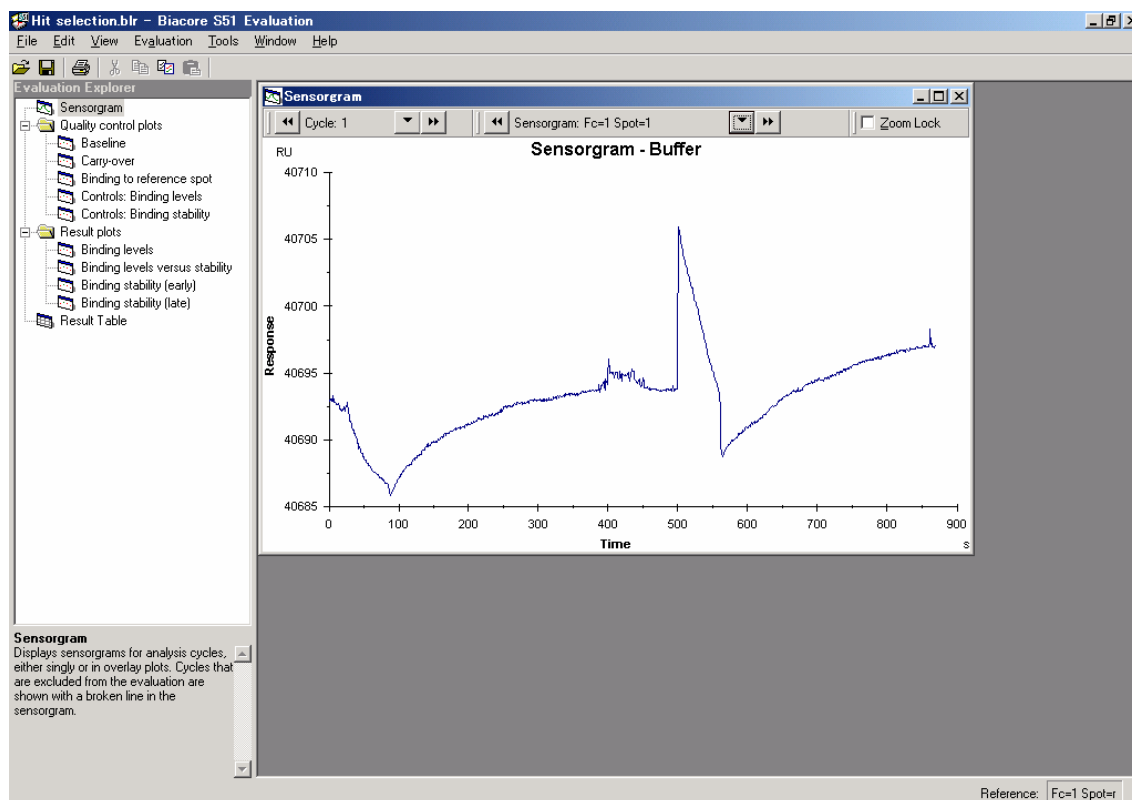
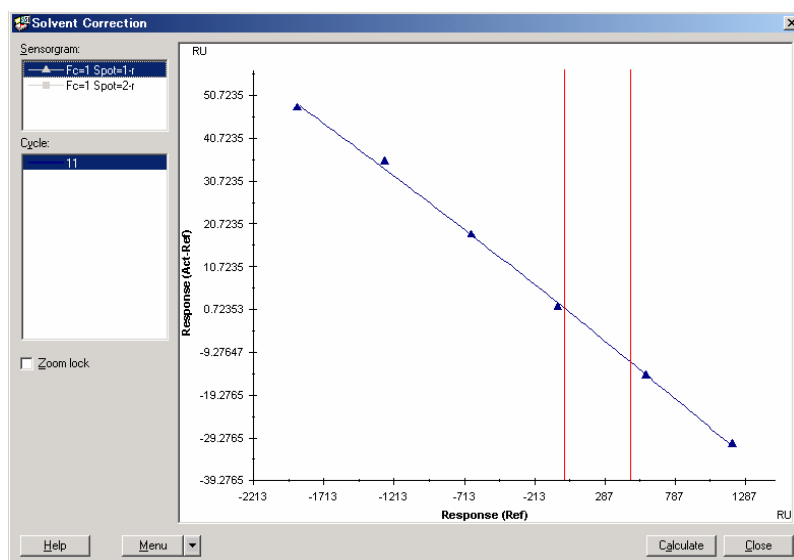
↓

Hit Selection - Adaptivity Parameters
Perform regeneration if ...
the relative response after dissociation exceeds: (RU) in spot 1-r, or
(RU) in spot 2-r
Maximum number of consecutive regeneration injections: 3
Repeat the stabilization period if ...
the response changes more than: (RU/30 s) in spot 1-r, or
(RU/30 s) in spot 2-r
Maximum number of extra stabilization periods: 3
Perform carry-over control if ...
the relative response at the end of the injection exceeds: (RU) in spot 1-r, or
(RU) in spot 2-r
Maximum number of carry-over controls: 3
Help
< Back
Next >
Close

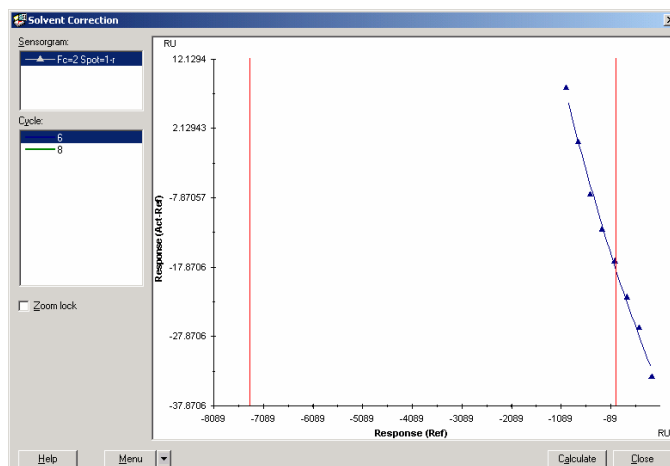
↓

以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

3-2-2.　データ解析

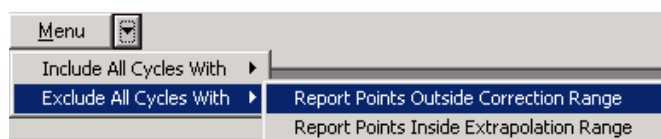
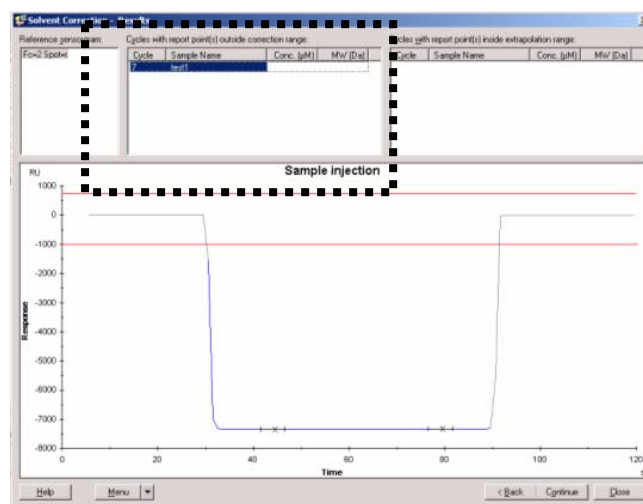
測定が終了すると、自動的に解析専用の Evaluation ソフトウェアが立ち上がり、取得データが移行される。

Menu bar 内 **Evaluation** → **Solvent correction** をクリックする。

（補正曲線上の 2 本の赤線は、全アナライトのリファレンスセルのバルクレスポンスの範囲である。）**Calculate** をクリックする。

データの削除

アナライトの調製ミス、エアー混入等の測定エラー等の理由で、アナライトのリファレンスセルのバルクレスポンスが補正曲線内に入らない場合、測定データを解析から削除することができる。

Calculate をクリックする。

↓

補正曲線内に入らなかったサイクルとアナライト名およびセンサーグラムが表示される。

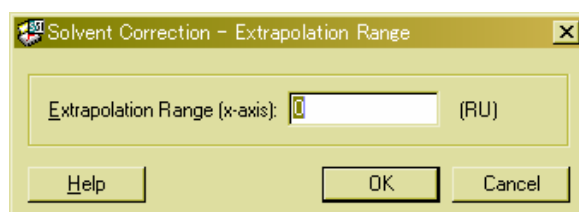
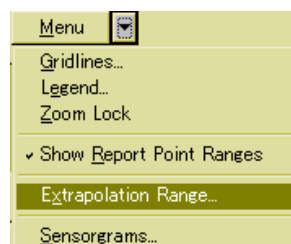
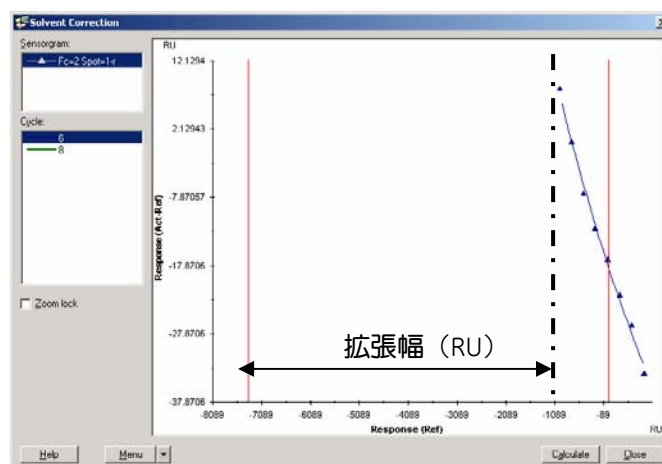
Menu
Include All Cycles With
Exclude All Cycles With
Report Points Outside Correction Range
Report Points Inside Extrapolation Range

補正曲線内に入らなかったアナライトも補正を行う場合は　そのまま、**Continue** をクリックする。

補正曲線の拡張

補正曲線の Response(Ref)の幅の 10%未満であれば、補正曲線を拡張することで、補正曲線内に入らなかったアナライトを補正することができる。10%以上外れている場合は、補正しても補正後のデータの信頼性は低いので注意する。

拡張幅（RU）

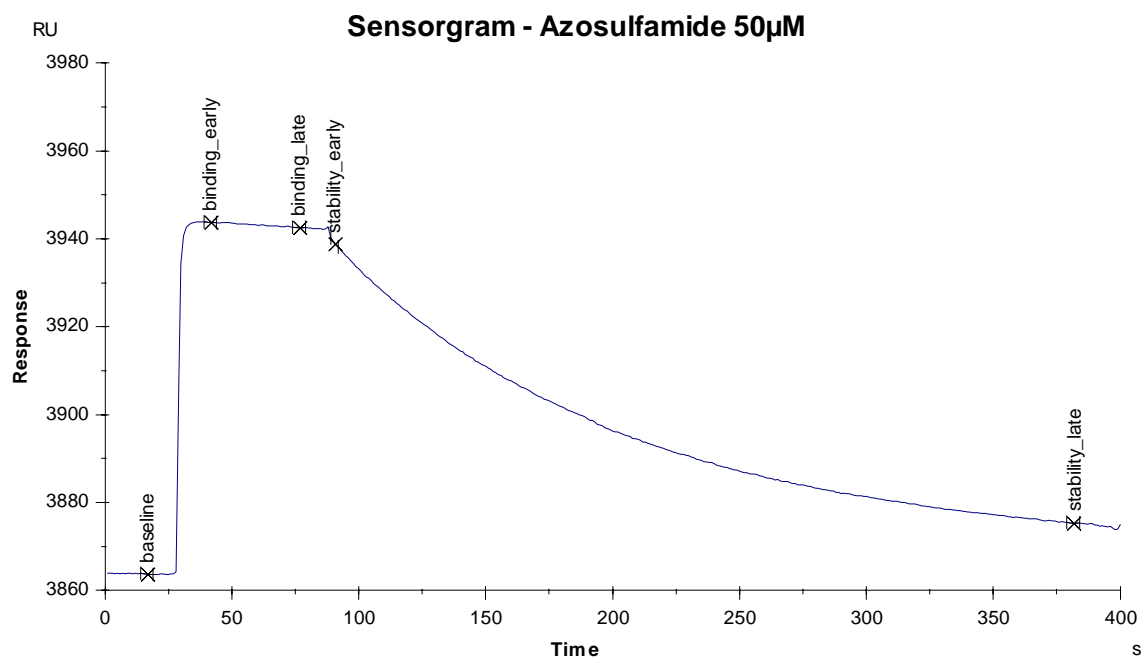
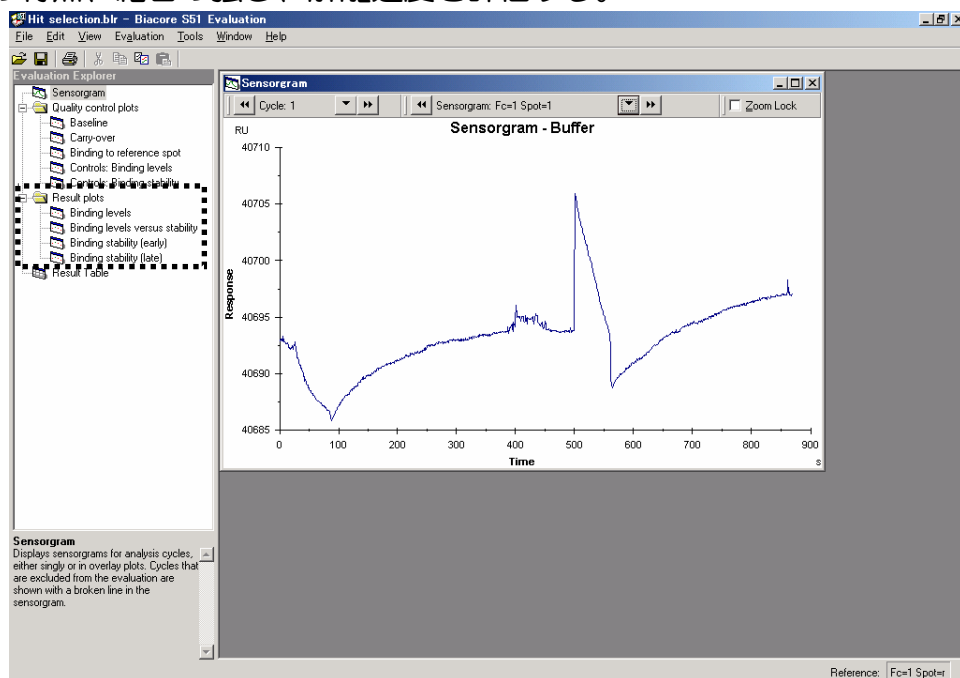
Menu
Gridlines...
Legend...
Zoom Lock
Show Report Point Ranges
Extrapolation Range...
Sensorgrams...

Solvent Correction - Extrapolation Range
Extrapolation Range (x-axis): 0 (RU)
Help OK Cancel

拡張する Response（Ref）の幅を入力し、**OK** をクリックする。

3-2-3. 解析結果の評価

①Evaluation Explorer の Result plots を用いた評価

測定時に自動的に記録されたレポートポイントをもとに簡便に評価する。

Sensorgram - Azosulfamide 50μM

結合の有無、結合の強さ、解離速度を評価する。

（結合の有無の簡易評価；Binding levels）

Evaluation Explorer の Binding levels をダブルクリックする。

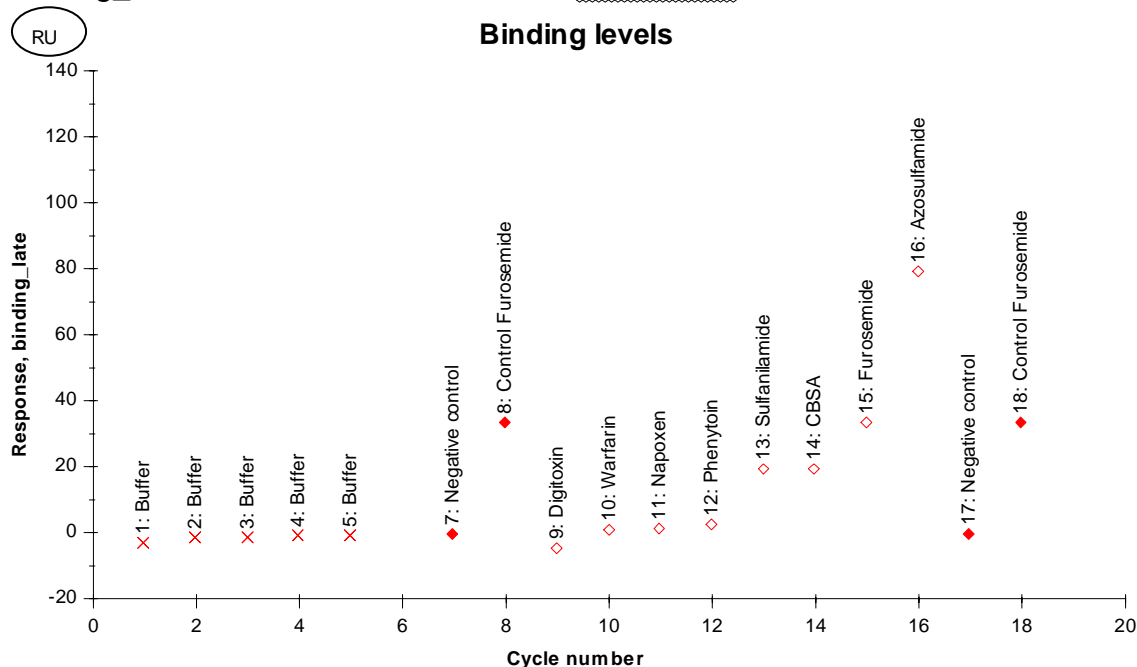
binding_late のレスポンスのプロット。結合の有無を判断するときに使用する。

RU

Binding levels

Response, binding_late

1: Buffer
2: Buffer
3: Buffer
4: Buffer
5: Buffer
7: Negative control
8: Control Furosemide
9: Digitoxin
10: Warfarin
11: Napoxen
12: Phenytoin
13: Sulfanilamide
14: CBSA
15: Furosemide
16: Azosulfamide
17: Negative control
18: Control Furosemide

Cycle number

Buffer や Negative control サンプルのレスポンスを基準に評価を行う。それらのレスポンスに対し、大きな値を示すサンプルは結合（ヒット）アナライトとして選択する。

（結合の強さの簡易評価；Binding levels）

同一アナライト濃度で試験している場合に有効。レスポンス（RU）は測定しているアナライトの分子量（Da）が反映される。異なる分子量を持つアナライトの結合の強さの比較を行うにはレスポンスを分子量で補正する。

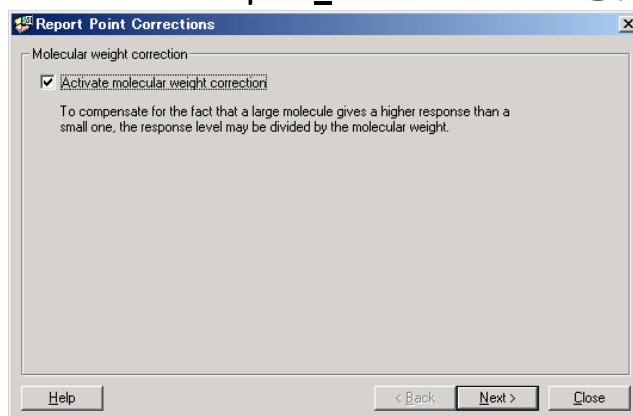
menu bar の **Evaluation** → **Report Point Corrections...**をクリックする。

Report Point Corrections

Molecular weight correction

Activate molecular weight correction

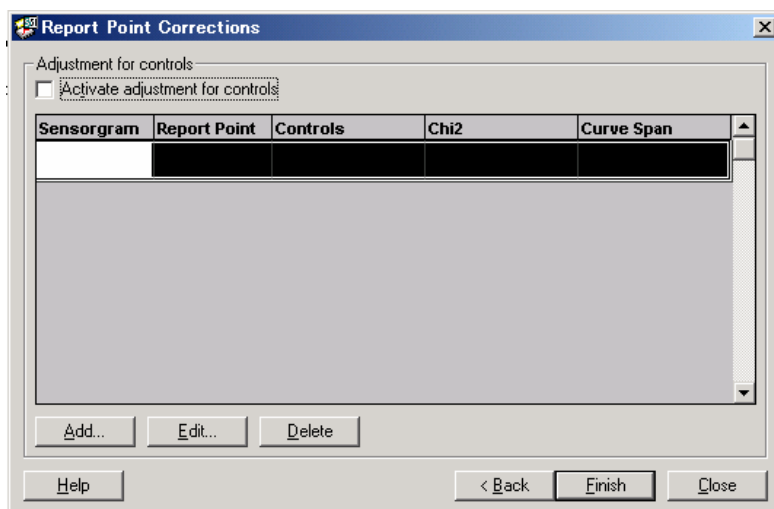
To compensate for the fact that a large molecule gives a higher response than a small one, the response level may be divided by the molecular weight.

Help　< Back　Next >　Close

Activate weight correction にチェックを入れ、**Next >**をクリックする。

↓

Report Point Corrections
Adjustment for controls
Activate adjustment for controls

Sensorgram	Report Point	Controls	Chi2	Curve Span

Add... Edit... Delete
Help < Back Finish Close

Finish をクリックする。

↓

Evaluation Explorer 中のすべてのプロットのレスポンスが分子量補正され、単位が **RU** から **100*RU/Da** に変更される。

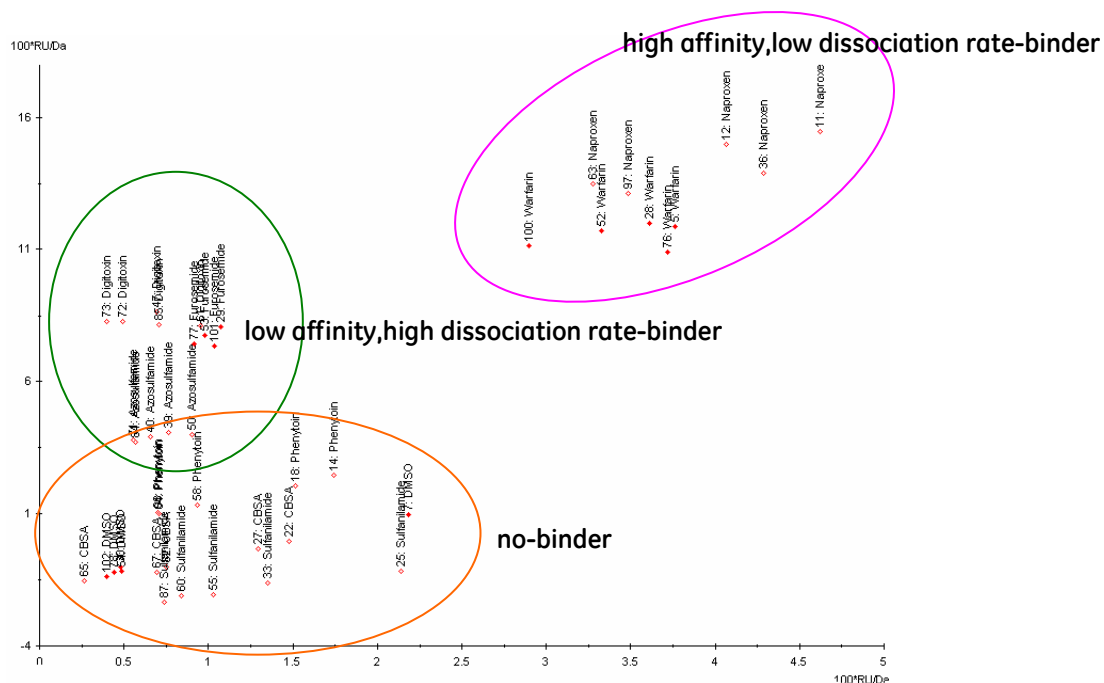
Evaluation Explorer の **Binding levels** をダブルクリックする。

（結合の強さと解離の速さの簡易同時評価；Binding levels）

Evaluation Explorer の Binding levels versus stability をダブルクリックする。

high affinity,low dissociation rate-binder

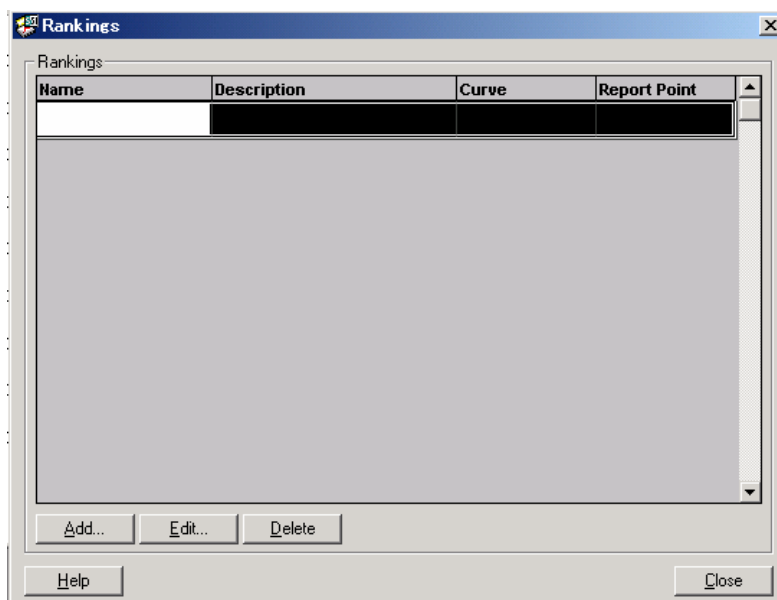
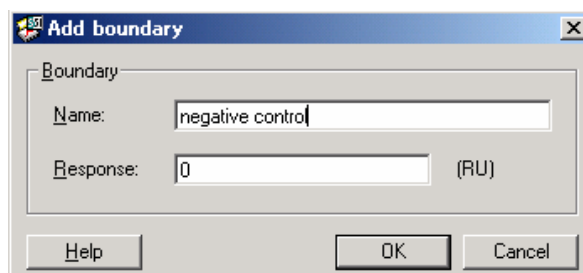
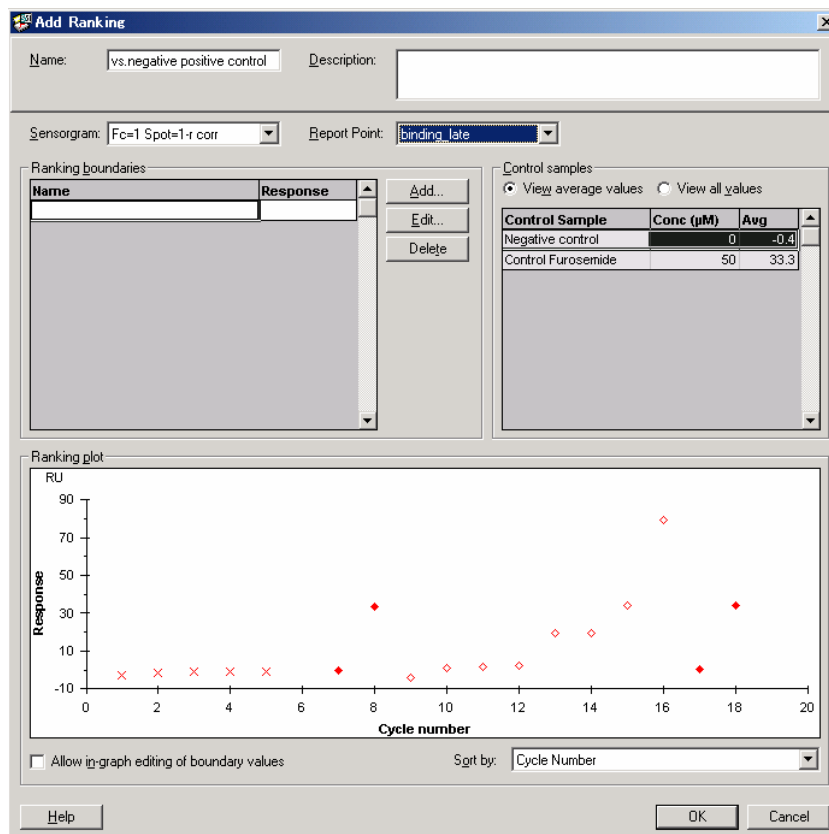
low affinity,high dissociation rate-binder

no-binder

リガンドに対して結合しないアナライト、結合するが速やかに解離するアナライト、安定的に結合するアナライト等の特徴付けが可能である。

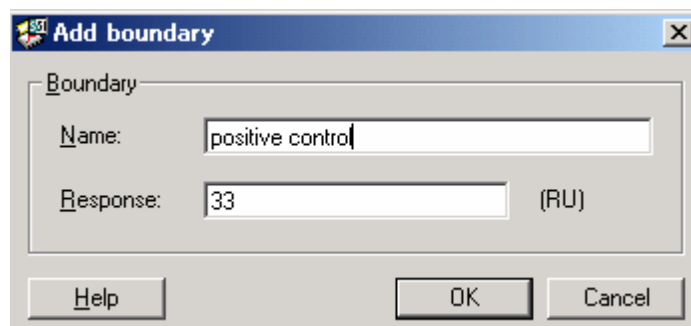
結合するアナライトをピックアップし、引き続き、解離定数（K_D 値）、反応速度定数（k_a 値、k_d 値）算出の実験を行う場合は、センサーグラムを見て、実験系の構築を行う。

結合（ヒット）アナライトを容易にピックアップするための補助ツール

プロット内に閾値をわかりやすくするためのラインを加える。（競合実験を行った際の評価に便利である。）

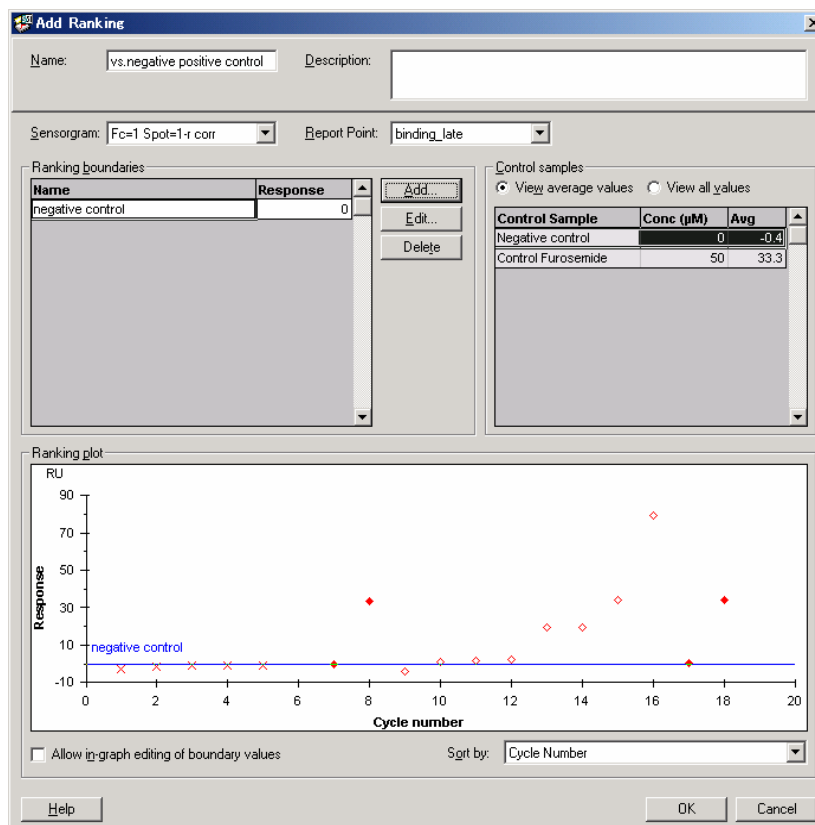
Menu → Evaluation → **Rankings...**をクリックする。

Add...をクリックする

Name:に新規に作成するプロットテーブルの名前を任意に入力する。必要があればこの作成されるテーブルに関するコメントを Description:に入力する。Sensorgram:に評価するデータを選択する。また Report Point:に評価対象とするレポートポイント名を選択する。

↓

Add...をクリックする。

Name:に閾値の名前、その値を Response:に入力し、**OK** をクリックする。（ネガティブコントロールやポジティブコントロールアナライトのレスポンスを使用することが多い。）

↓

Ranking plot 内にレスポンス 0RU の位置に negative control と名前が付いたラインが入る。

↓

引き続き、他の閾値も同時に引く場合には、再度 **Add...**をクリックする。

Add boundary

Boundary

Name: positive control

Response: 33 (RU)

Help OK Cancel

Name:、Response:を入力し、**OK** をクリックする。

↓

Ranking plot 内の 33RU の位置に positive control と名前が付いたラインが引かれる。

Add Ranking

Name: vs.negative positive control Description:

Sensorgram: Fc=1 Spot=1-r corr Report Point: binding_late

Ranking boundaries

Name	Response
positive control	33
negative control	0

Add... Edit... Delete

Control samples

View average values View all values

Control Sample	Conc (µM)	Avg
Negative control	0	-0.4
Control Furosemide	50	33.3

Ranking plot

RU Response Cycle number positive control negative control

Allow in-graph editing of boundary values Sort by: Cycle Number

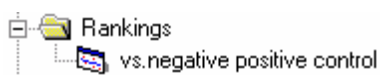
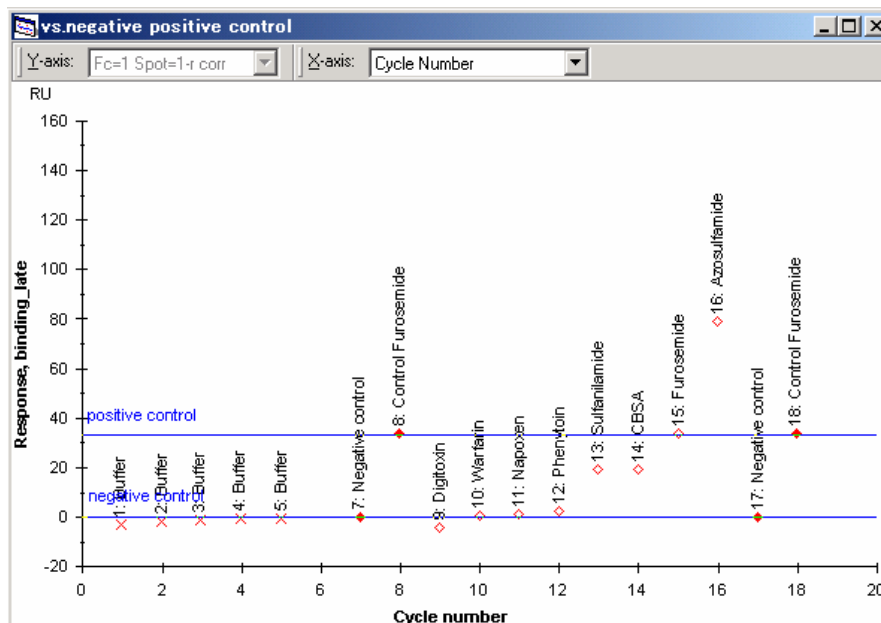
Help OK Cancel

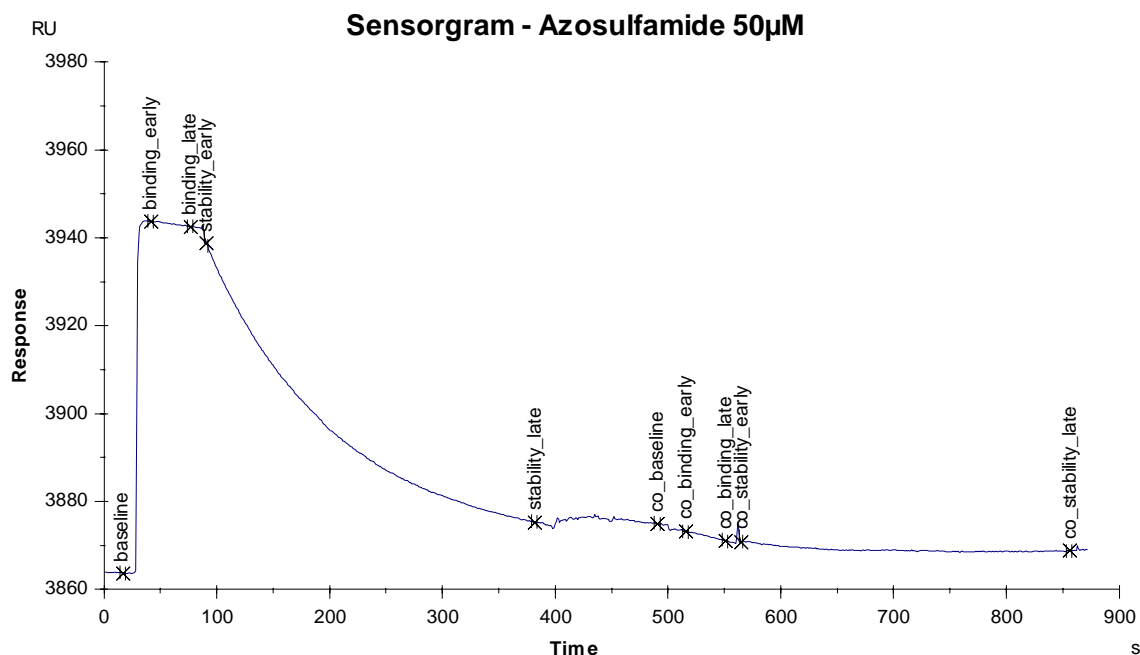
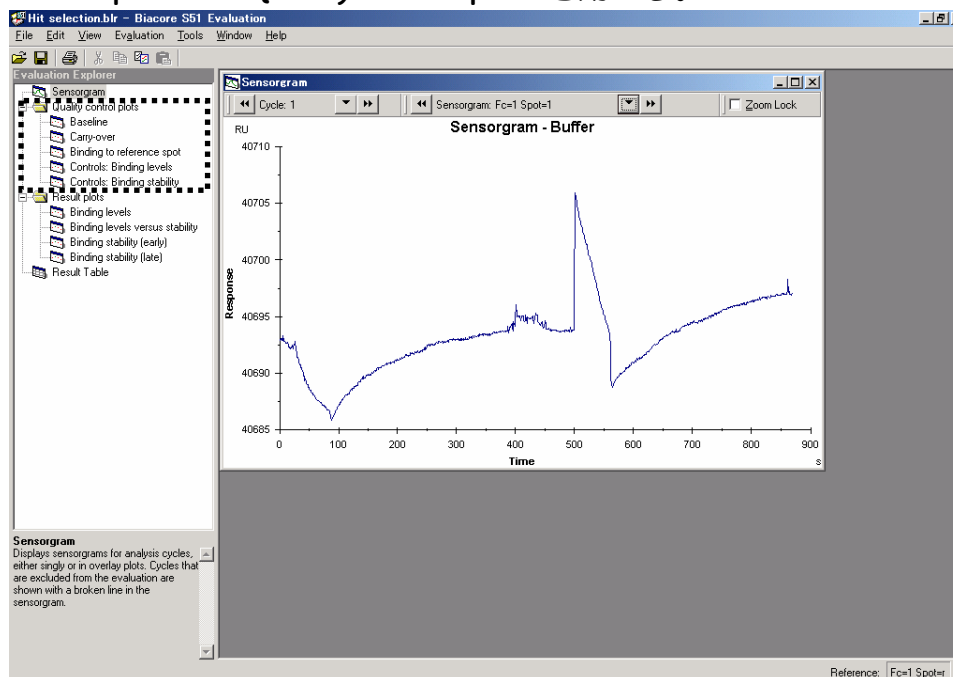
OK をクリックする。

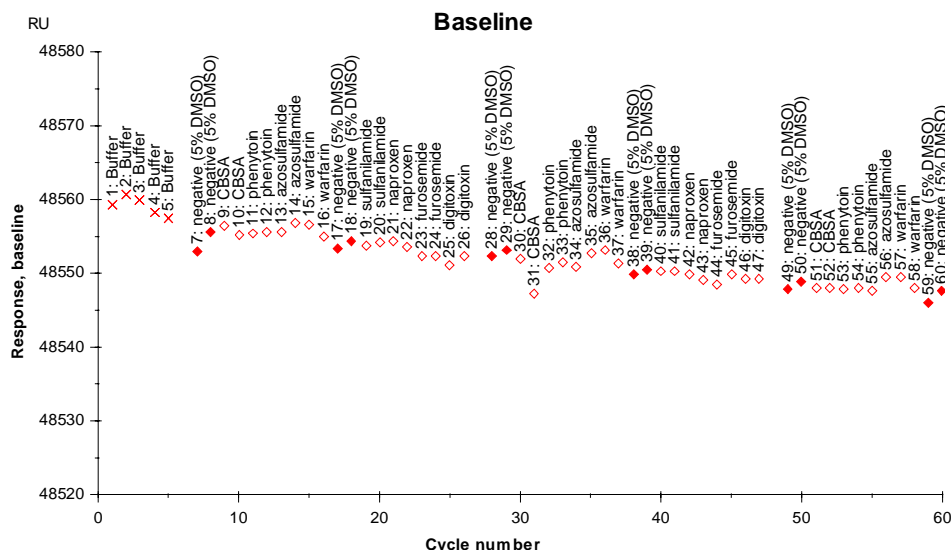
↓

他の項目のプロットテーブルを作成する場合は、**Add...**を選択、必要がなければ **Close** をクリックする。

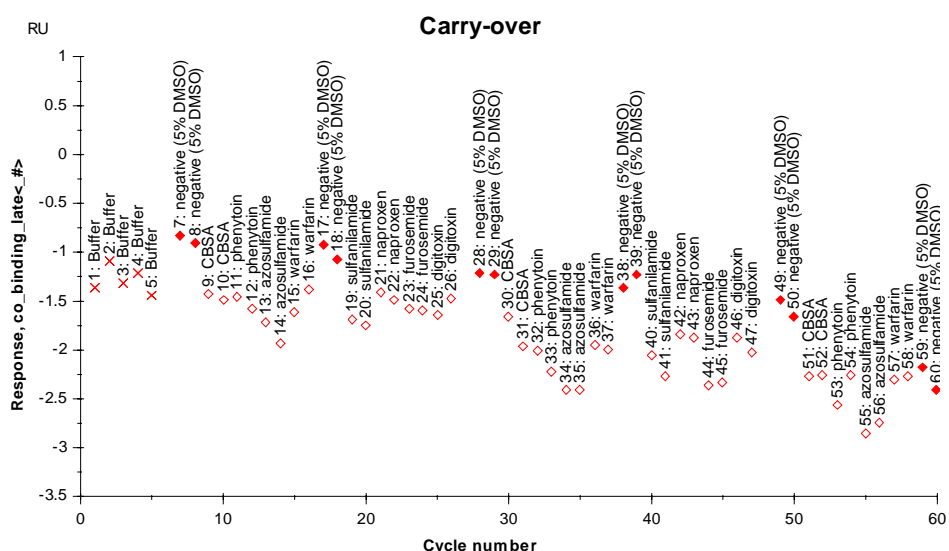
↓

画面左側の Evaluation Explorer 中の Ranking フォルダの下流に、解析結果が保存される。

そのファイルをダブルクリックすると、作成したプロットが表示できる。

（測定結果の正当性の評価）

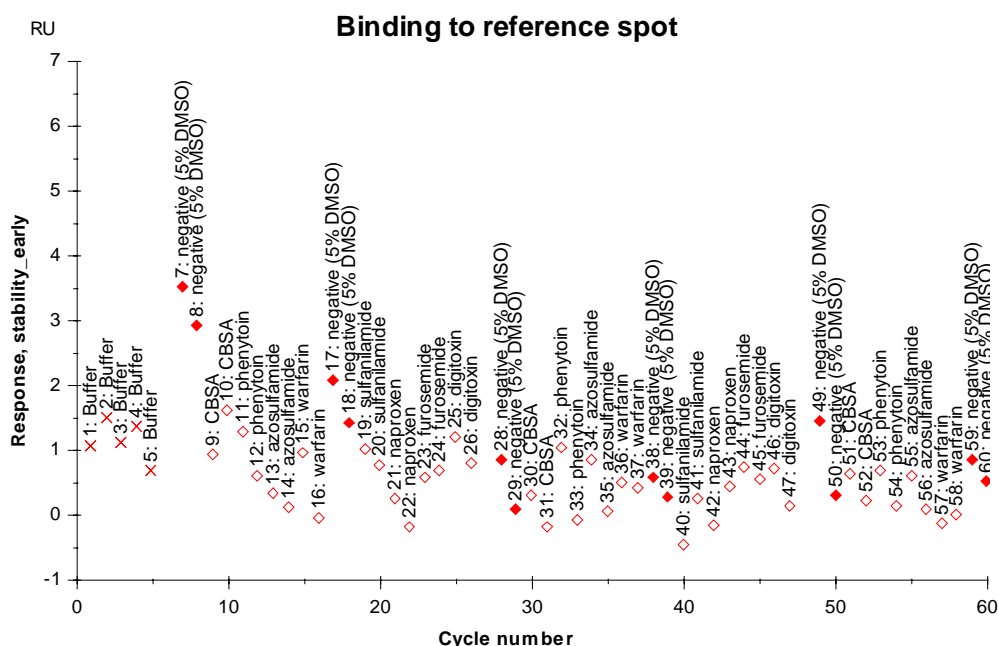
測定時に自動的に記録されたレポートポイントをもとに評価する。

Evaluation Explorer の Quality control plots を用いる。

Baseline

baseline の絶対値の測定サイクルに対するプロット。

物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離することにより右肩下がりになるケースが多い。ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが一定であれば問題ない。ポジティブコントロールサンプルがない場合全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の 10%未満であれば測定結果を評価するのに影響はない。

Carry-over

co_binding_late の co_baseline に対する相対値のプロット。

Buffer のレスポンスに対して大きいアナライトはニードルや流路等に吸着する性質を持つ。キャリーオーバーが激しいアナライトの次サイクルのアナライトの結合レスポンスはそれを考慮して評価する必要がある。

Binding to reference spot

stability_early の baseline に対する相対値のプロット。

Startup cycle 時の Buffer のレスポンスに対し、大きいレスポンスのサンプルはセンサーチップ表面へ非特異的に吸着する性質を持つ。それを考慮した上で評価を行う。

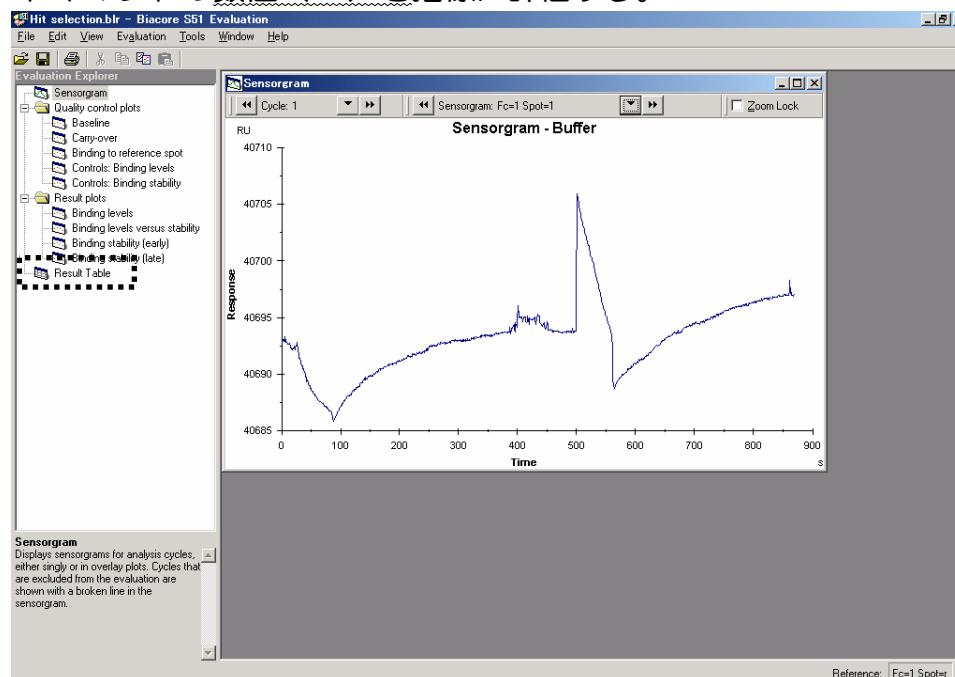
Controls:Binding levels

コントロールサンプルの binding_late の baseline に対する相対値のプロット。コントロールサンプルの測定を実験系に組み込んでいる場合にのみプロット表示される。レスポンスの高さが全サイクルにおいて一定であれば測定中のリガンドの活性は維持されていると評価できる。徐々に右肩下がりになっている場合はリガンドの活性が低下してきている等の問題が考えられるが、評価サンプルの結合の有無は Result plots から一定サイクルごとに測定されているコントロールサンプルの高さを基準に判断することができる。

Controls:Binding stability

コントロールサンプルの stability_early の baseline に対する相対値のプロット。評価基準は **Controls:Binding levels** と同様。ただし、コントロールサンプルの解離速度が速い場合にはレスポンスはベースラインに近い値となるので評価に適していない。

②Evaluation Explorer の Result Table を用いた評価

レポートポイントの数値（RU）を指標に評価する。

Evaluation Explorer の **Result Table** をダブルクリックする。

↓

全センサーグラムの全レポートポイントの数値（RU）が表示される。

Cycle	Included	Cycle Type	Position	Sample Name	MW (Da)	Conc. (µM)	Binding levels		Binding stability		
							Fc=1 Spot=1-r corr	Fc=1 Spot=2-r corr	Fc=1 Spot=1	Fc=1 Spot=2	Fc=1
							Resp (RU)	Resp (RU)	Resp (RU)	Resp (RU)	Resp
1	Yes	Startup	S1	Buffer			-12.4	0.3	0.7	1.8	
2	Yes	Startup	S1	Buffer			-4.6	3.6	-2.1	1.2	
3	Yes	Startup	S1	Buffer			-3.0	3.6	-2.6	1.0	
4	Yes	Startup	S1	Buffer			-2.8	3.3	-2.6	1.0	
5	Yes	Startup	S1	Buffer			-1.8	3.4	-2.2	1.1	
6	Yes	Startup	S1	Buffer			-1.2	3.5	-2.4	0.9	
7	Yes	Startup	S1	Buffer			-0.6	3.5	-1.9	1.1	
8	Yes	Startup	S1	Buffer			0.0	3.4	-2.0	1.0	
9	Yes	Startup	S1	Buffer			1.9	4.9	-0.9	1.3	
10	Yes	Startup	S1	Buffer			1.0	3.9	-1.8	1.1	
12	Yes	Control Sample	R1D12	5% DMSO			0.2	0.6	-0.2	-1.3	
13	Yes	Control Sample	R1D12	5% DMSO			5.0	2.8	-1.2	-1.1	
14	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.4	10.8	-1.4	-1.2	
15	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.9	11.0	-1.6	-1.3	
16	Yes	Sample	R1A2	A-2	590.7	30.0	10.3	4.9	-1.4	-1.5	
17	Yes	Sample	R1A2	A-2	590.7	30.0	11.0	4.9	-1.2	-1.2	
18	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	43.7	14.0	-1.6	-1.9	
19	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	44.2	14.9	-1.7	-1.3	
20	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	52.0	12.6	6.0	-1.1	
21	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	51.6	12.6	5.7	-1.2	
22	Yes	Control Sample	R1D11	5% DMSO			8.4	3.7	-1.1	-1.3	
23	Yes	Control Sample	R1D11	5% DMSO			8.8	4.5	-1.1	-1.2	
24	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.9	7.5	4.2	-1.3	
25	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.6	7.7	4.4	-1.6	
26	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6	15.1	18.6	-1.4	
27	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6	15.2	18.4	-1.5	
28	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	59.1	13.3	7.5	-1.5	
29	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	58.4	12.9	7.6	-1.5	
30	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	50.8	12.3	13.2	-1.2	
31	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	51.2	13.0	13.8	-1.3	
32	Yes	Control Sample	R1D10	5% DMSO			10.1	5.1	-0.6	-1.9	
33	Yes	Control Sample	R1D10	5% DMSO			10.7	6.0	-0.2	-1.4	
34	Yes	Sample	R1A9	A-9	536.0	30.0	34.5	8.6	4.1	-1.2	

（結合の有無の評価）

見やすいように、必要なカラムのみを抽出し、評価を行うことをお奨めする。

カラムの抽出

Menu bar の **Data** → **Table Columns...** をクリックする。

Table Columns
General | Plots | Markers | Statistics | Rankings | Characterization
Sample Data Columns
☑ Included
☑ Cycle Type
☑ Position
☑ Sample Name
☑ MW (Da)
☑ Conc. (µM)
Data Corrections
☑ Solvent correction
Help | Menu | OK | Cancel

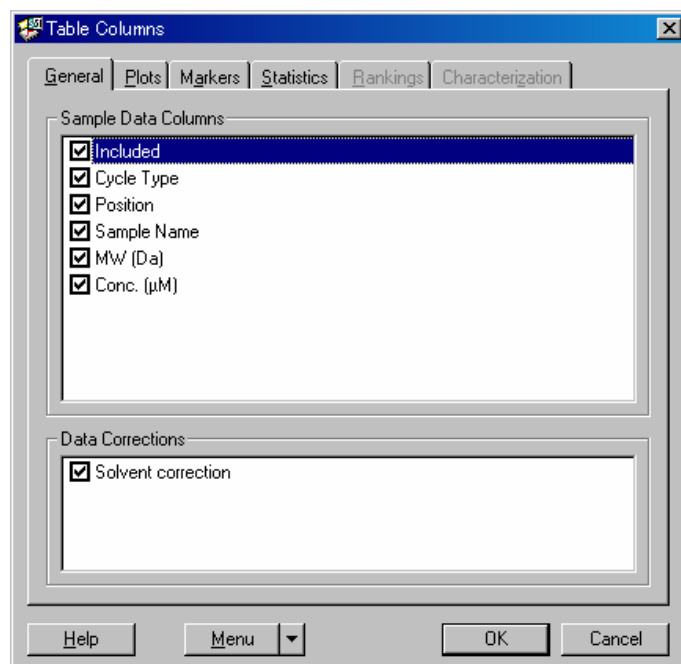
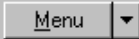



Table Columns の各種タブ内のカラムから必要項目を選択する。

General タブ内の項目はすべて選択。**Plots** タブをクリックする。

↓

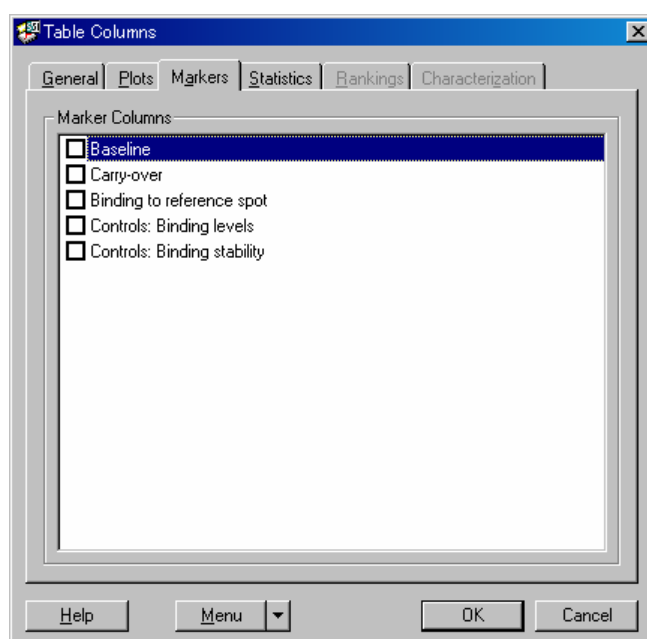
Table Columns
General | Plots | Markers | Statistics | Rankings | Characterization
Plot Columns
☑ Binding levels Fc=1 Spot=1-r corr
☐ Binding levels Fc=1 Spot=2-r corr
☐ Binding stability (early) Fc=1 Spot=1
☐ Binding stability (early) Fc=1 Spot=2
☐ Binding stability (early) Fc=1 Spot=1-r
☐ Binding stability (early) Fc=1 Spot=2-r
☐ Binding stability (late) Fc=1 Spot=1
☐ Binding stability (late) Fc=1 Spot=2
☐ Binding stability (late) Fc=1 Spot=1-r
☐ Binding stability (late) Fc=1 Spot=2-r
☐ Baseline Fc=1 Spot=1
☐ Baseline Fc=1 Spot=r
☐ Baseline Fc=1 Spot=2
☐ Carry-over Fc=1 Spot=1-r corr
☐ Carry-over Fc=1 Spot=2-r corr
☐ Binding to reference spot Fc=1 Spot=r
Help | Menu | OK | Cancel

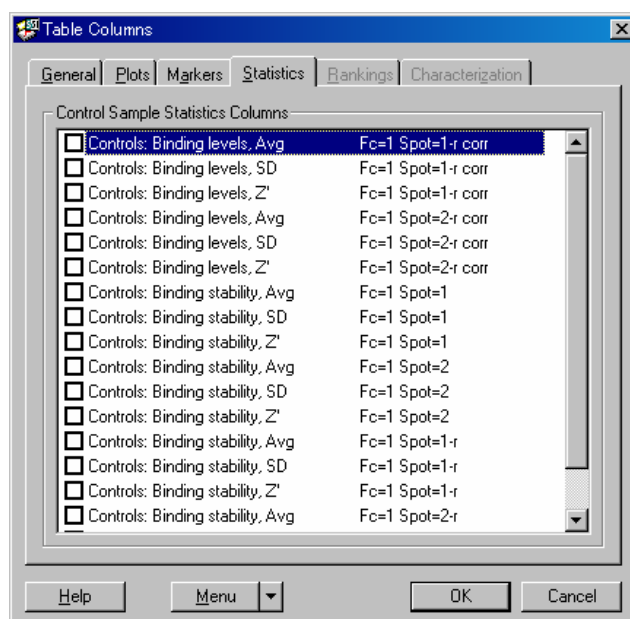
Binding levels にチェックを入れる。

タブ内の選択項目が極端に多い、もしくは少ない場合は、Menu の **Select All**、**Deselect All** コマンドで、最初にすべて選択、あるいはすべて削除する機能を利用すると便利である。

↓

Markers タブ内の項目のチェックはすべて外す。

↓

Statistics タブ内の項目のチェックもすべて外す。

↓

OK をクリックする。

Cycle	Included	Cycle Type	Position	Sample Name	MW (Da)	Conc. (µM)	Binding levels Fc=1 Spot=1-r corr Resp (RU)
1	Yes	Startup	S1	Buffer			-12.4
2	Yes	Startup	S1	Buffer			-4.6
3	Yes	Startup	S1	Buffer			-3.0
4	Yes	Startup	S1	Buffer			-2.8
5	Yes	Startup	S1	Buffer			-1.8
6	Yes	Startup	S1	Buffer			-1.2
7	Yes	Startup	S1	Buffer			-0.6
8	Yes	Startup	S1	Buffer			0.0
9	Yes	Startup	S1	Buffer			1.9
10	Yes	Startup	S1	Buffer			1.0
12	Yes	Control Sample	R1D12	5% DMSO			0.2
13	Yes	Control Sample	R1D12	5% DMSO			5.0
14	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.4
15	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.9
16	Yes	Sample	R1A2	A-2	590.7	30.0	10.3
17	Yes	Sample	R1A2	A-2	590.7	30.0	11.0
18	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	43.7
19	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	44.2
20	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	52.0
21	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	51.6
22	Yes	Control Sample	R1D11	5% DMSO			8.4
23	Yes	Control Sample	R1D11	5% DMSO			8.8
24	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.9
25	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.6

Binding levels のカラムのみが表示される。

（結合量のランキング）

レスポンスの高いものから順に並べ替える。

Menu bar の **Data** → **Sort Data...** をクリックする。

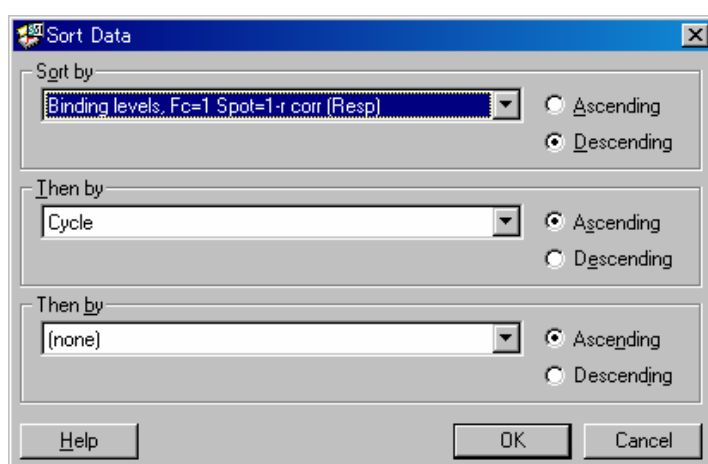
Sort Data

Sort by
Binding levels, Fc=1 Spot=1-r corr (Resp)
Ascending
Descending

Then by
Cycle
Ascending
Descending

Then by
(none)
Ascending
Descending

Help OK Cancel

↓

Sort by に Binding levels を選択し、**Descending** にチェックを入れ **OK** をクリックする。

データの並び替えが完了する。

Cycle	Included	Cycle Type	Position	Sample Name	MW (Da)	Conc. (µM)	Binding levels Fc=1 Spot=1-r corr Resp (RU)
26	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6
27	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6
50	Yes	Sample	R1B3	A-15	622.8	30.0	70.2
49	Yes	Sample	R1B3	A-15	622.8	30.0	70.0
28	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	59.1
29	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	58.4
42	Yes	Sample	R1A12	A-12	588.4	30.0	54.3
41	Yes	Sample	R1A12	A-12	588.4	30.0	53.9
40	Yes	Sample	R1A11	A-11	540.0	30.0	53.6
20	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	52.0
21	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	51.6
31	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	51.2
30	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	50.8
45	Yes	Sample	R1B1	A-13	543.9	30.0	50.0
46	Yes	Sample	R1B1	A-13	543.9	30.0	49.3
69	Yes	Sample	R1B10	B-6	378.4	30.0	49.1
39	Yes	Sample	R1A11	A-11	540.0	30.0	48.9
68	Yes	Sample	R1B10	B-6	378.4	30.0	48.1
24	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.9
25	Yes	Sample	R1A5	A-5	540.0	30.0	44.6
19	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	44.2
105	Yes	Sample	R1D1	Indoprofen	281.3	30.0	43.9
18	Yes	Sample	R1A3	A-3	600.4	30.0	43.7
106	Yes	Sample	R1D1	Indoprofen	281.3	30.0	43.7
15	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.9
14	Yes	Sample	R1A1	A-1	538.0	30.0	42.4
51	Yes	Sample	R1B4	A-16	550.0	30.0	40.1
52	Yes	Sample	R1B4	A-16	550.0	30.0	40.0
56	Yes	Sample	R1B5	B-1	446.5	30.0	39.5

↓

必要に応じて、さらにレスポンスが（例）50RU 以上のものだけピックアップすることができる。

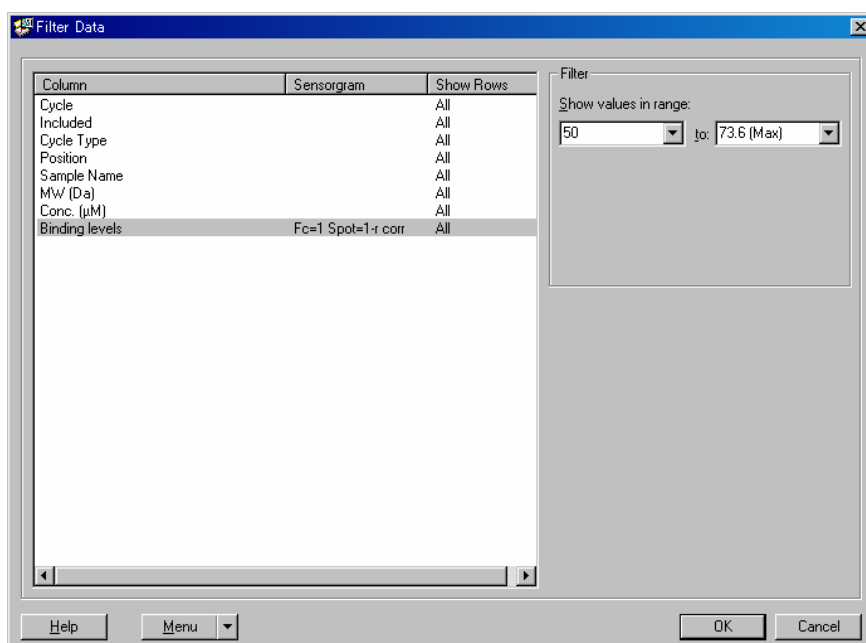
Menu bar の **Data** → **Filter Data...** をクリックする。

Filter Data

Column	Sensorgram	Show Rows
Cycle		All
Included		All
Cycle Type		All
Position		All
Sample Name		All
MW (Da)		All
Conc. (µM)		All
Binding levels	Fc=1 Spot=1-r corr	All

Filter

Show values in range: 50 to: 73.6 (Max)

Help　Menu　OK　Cancel

Column の **Binding levels** を選択し、さらに Filter の **Show values in range:** で左枠内に”50”を入力する。（右枠内にはレスポンスの最大値が入力されている。）

↓

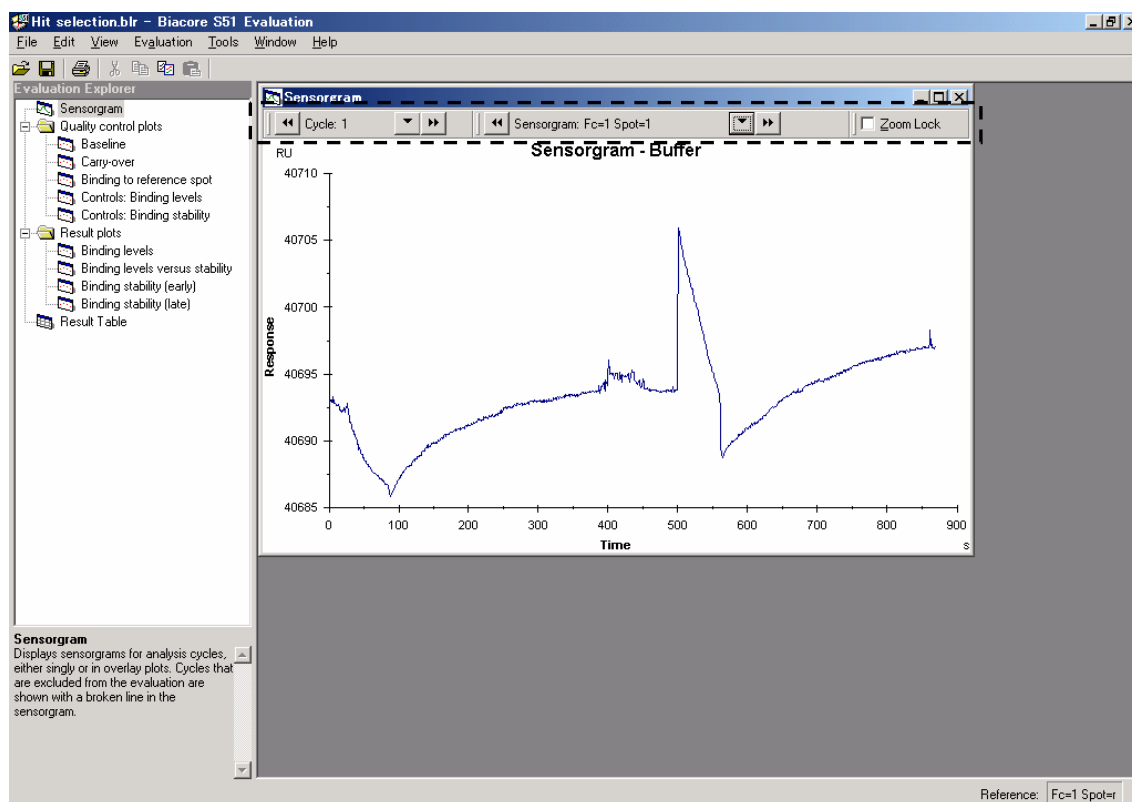
レスポンスが 50RU 以上のサンプルのみ表示される。

Cycle	Included	Cycle Type	Position	Sample Name	MW (Da)	Conc. (µM)	Binding levels Fc=1 Spot=1-r corr Resp (RU)
26	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6
27	Yes	Sample	R1A6	A-6	560.4	30.0	73.6
50	Yes	Sample	R1B3	A-15	622.8	30.0	70.2
49	Yes	Sample	R1B3	A-15	622.8	30.0	70.0
28	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	59.1
29	Yes	Sample	R1A7	A-7	588.4	30.0	58.4
42	Yes	Sample	R1A12	A-12	588.4	30.0	54.3
41	Yes	Sample	R1A12	A-12	588.4	30.0	53.9
40	Yes	Sample	R1A11	A-11	540.0	30.0	53.6
20	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	52.0
21	Yes	Sample	R1A4	A-4	584.4	30.0	51.6
31	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	51.2
30	Yes	Sample	R1A8	A-8	642.4	30.0	50.8

（結合の強さのランキング）

65 ページの分子量補正処理を行った後の **Result Table** 内の Binding level 等で表示される Resp.の単位は、すべて（**RU**）→（**100*RU/Da**）に変わる。この状態で、78 ページ以降の操作を同様に行う。

3-2-4.　センサーグラムの表示と編集

① センサーグラムの表示

測定サイクル選択ツールのをクリックし、データリストを表示する。

（1 サイクルずつデータを確認する際には、　をクリックする。）

見たいサイクルを選択し、OK をクリックする。

Sensorgram: Fc=1 Spot=1 測定フローセル、スポット選択ツールの▼をクリックし、見たいフローセル、スポットを選択する。

Select sensorgrams:

Curve name
Fc=1 Spot=1
Fc=1 Spot=1-r
Fc=1 Spot=1-r corr
Fc=1 Spot=2
Fc=1 Spot=2-r
Fc=1 Spot=2-r corr
Fc=1 Spot=r

Help OK Cancel

Fc=1 Spot=1	フローセル 1 のスポット 1 のセンサーグラム
Fc=1 Spot=1-r	フローセル 1 のスポット 1 からリファレンススポットのセンサーグラムを差し引きしたセンサーグラム
Fc=1 Spot=1-r corr	Fc=1 Spot=1-r に溶媒補正を適用したセンサーグラム

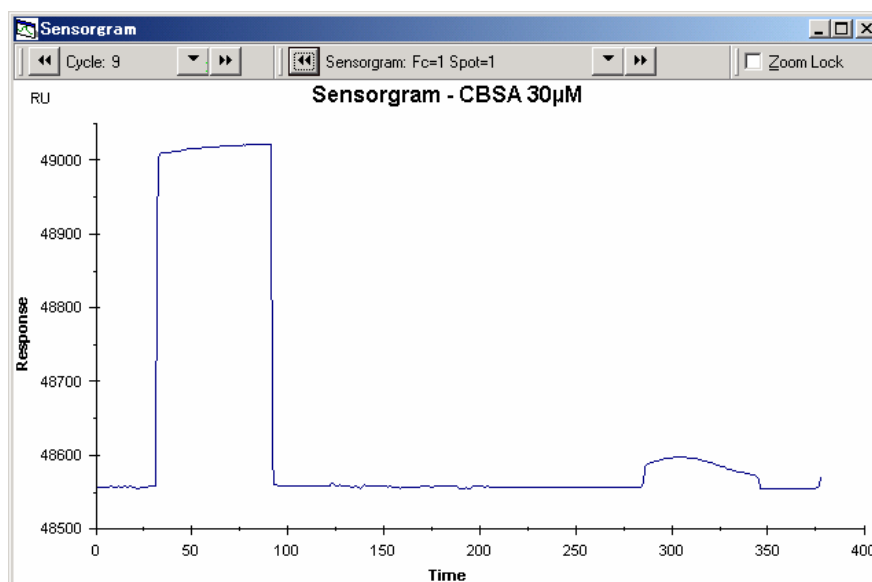
OK をクリックする。

Sensorgram

Cycle: 9 Sensorgram: Fc=1 Spot=1 Zoom Lock

Sensorgram - CBSA 30µM

RU Response 49000 48900 48800 48700 48600 48500

0 50 100 150 200 250 300 350 400 Time s

② センサーグラム上へのレポートポイントの表示

menu bar の **View** → **Report points** → **Marker and Id** を選択すると、センサーグラム上に自動的に記録されているレポートポイントを表示することができる。

③ センサーグラムの重ね書き

Sensorgram: Fc=1 Spot=1 測定フローセル、スポット選択ツールの▼をクリックし、見たいフローセル、スポットを選択する。

↓

Cycle: 1 測定サイクル選択ツールのをクリックし、データリストを表示する。

Select cycle:

Cycle	Cycle Type	Sample Name	Included
001	Startup	Buffer	Yes
002	Startup	Buffer	Yes
003	Startup	Buffer	Yes
004	Startup	Buffer	Yes
005	Startup	Buffer	Yes
006	Solvent Correction		Yes
007	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
008	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
009	Sample	CBSA	Yes
010	Sample	CBSA	Yes
011	Sample	phenytoin	Yes
012	Sample	phenytoin	Yes
013	Sample	azosulfamide	Yes
014	Sample	azosulfamide	Yes
015	Sample	warfarin	Yes
016	Sample	warfarin	Yes
017	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
018	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
019	Sample	sulfanilamide	Yes
020	Sample	sulfanilamide	Yes
021	Sample	naproxen	Yes
022	Sample	naproxen	Yes
023	Sample	furosemide	Yes
024	Sample	furosemide	Yes
025	Sample	digitoxin	Yes
026	Sample	digitoxin	Yes
027	Solvent Correction		Yes
028	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
029	Control Sample	negative (5% DMSO)	Yes
030	Sample	CBSA	Yes
031	Sample	CBSA	Yes
032	Sample	phenytoin	Yes
033	Sample	phenytoin	Yes
034	Sample	azosulfamide	Yes
035	Sample	azosulfamide	Yes
036	Sample	warfarin	Yes

Help OK Cancel

重ね書きしたいサイクルを選択する。連続したサイクルを選択する場合は、最初の Cycle をクリックし、下にドラッグして選択する。ランダムに選択する場合にはキーボードの Ctrl キーを押しながら Cycle をクリックしていく。

↓

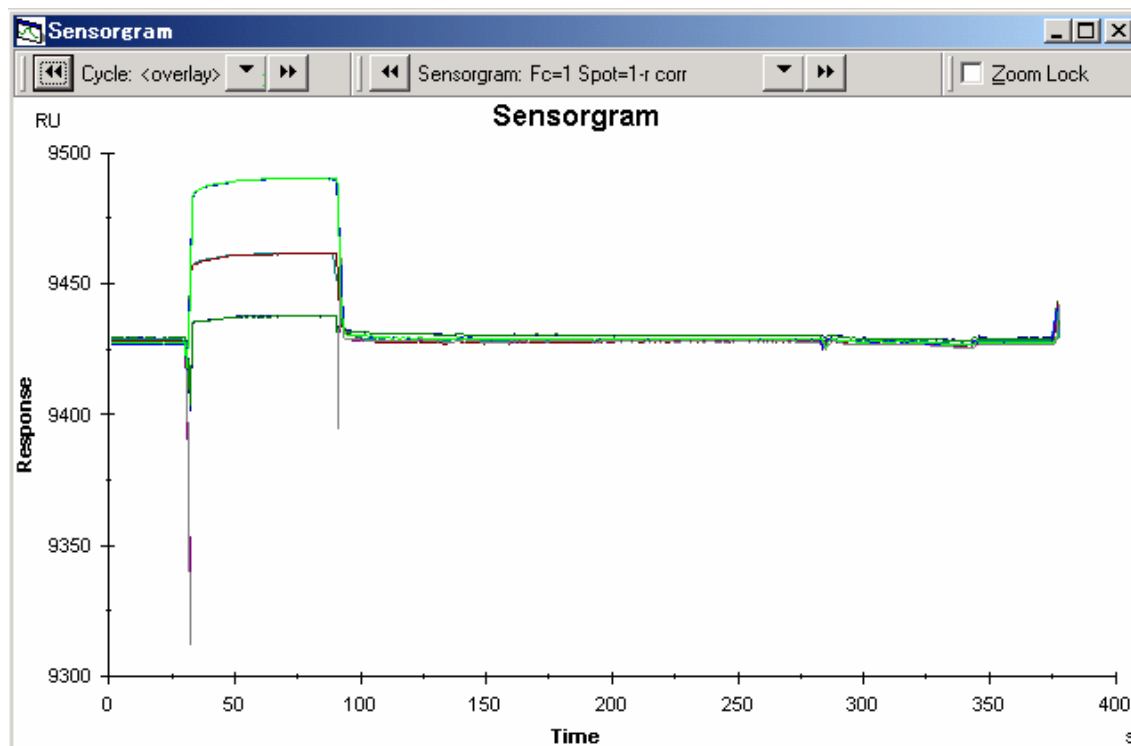
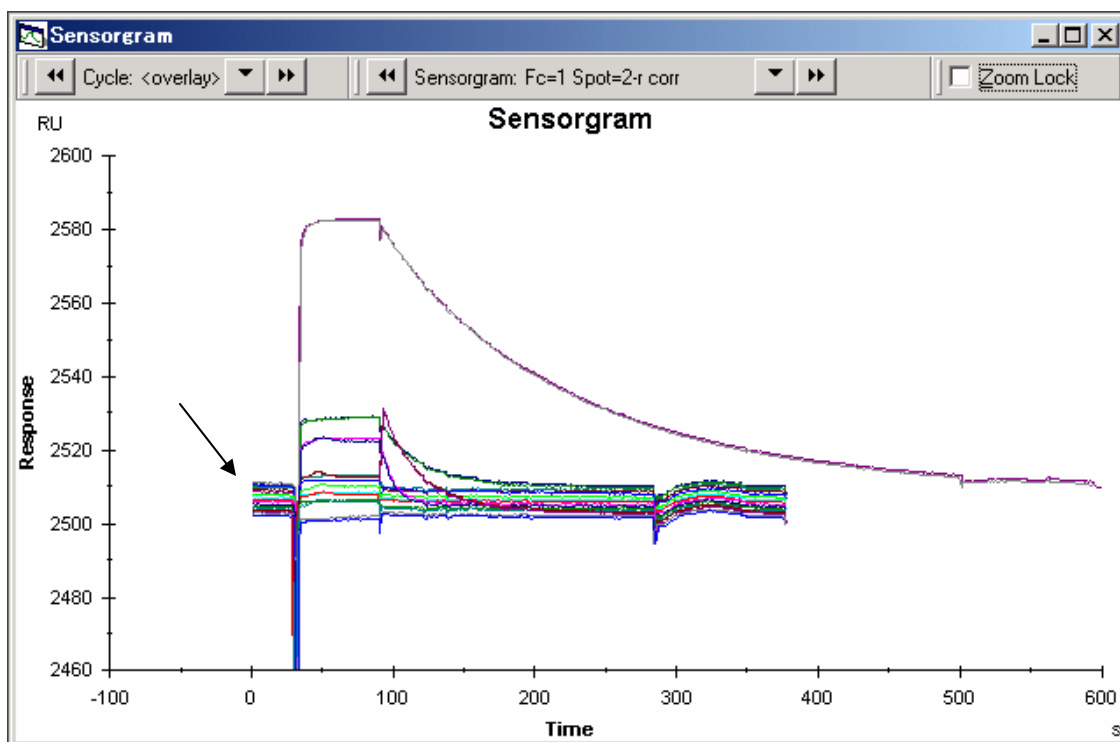
選択後 **OK** をクリックする。

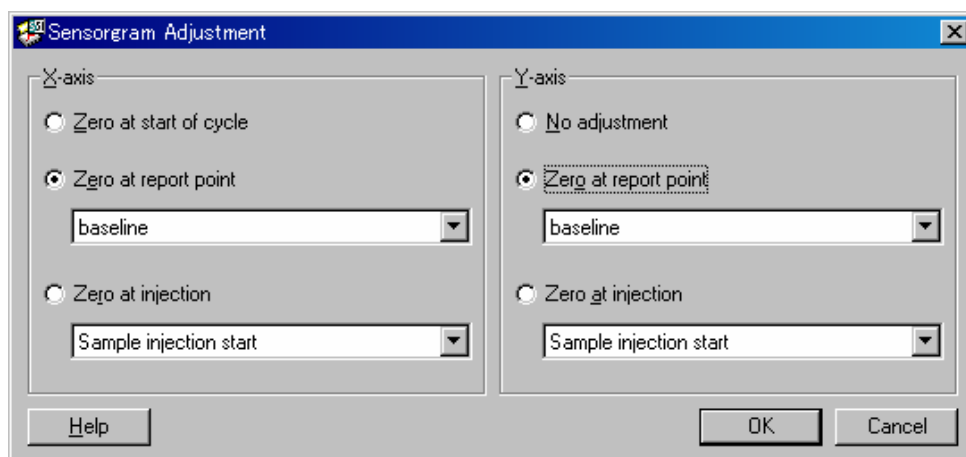
Sensorgram

Cycle: <overlay> Sensorgram: Fc=1 Spot=1-r corr Zoom Lock

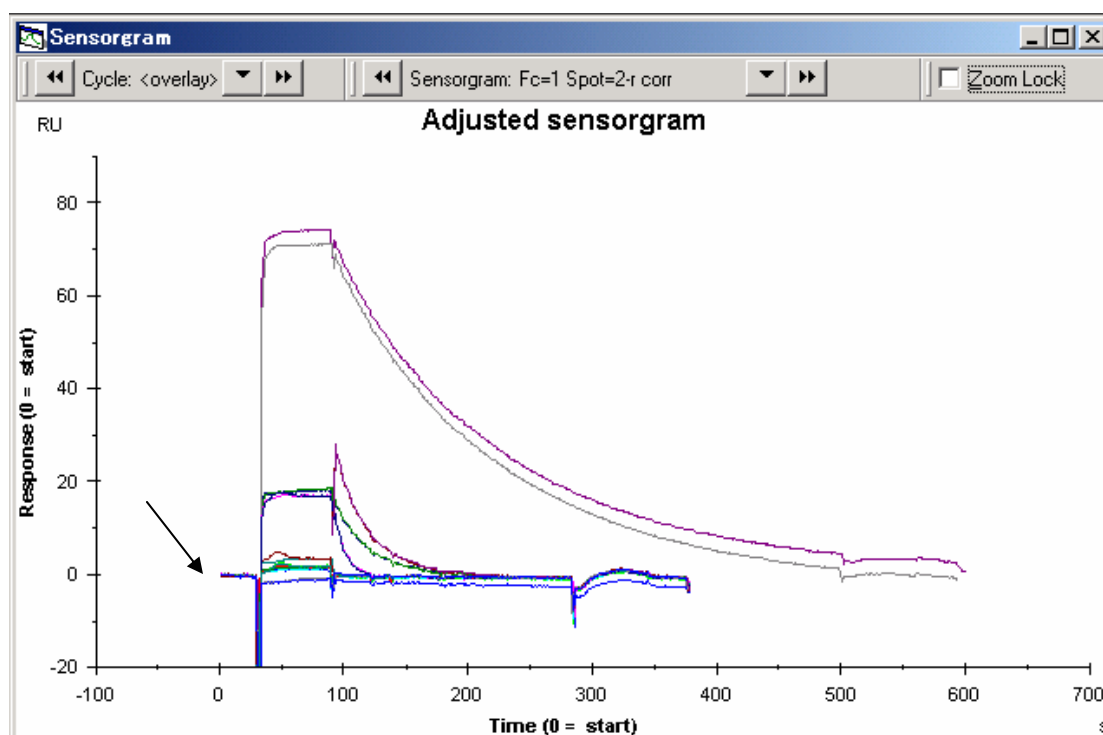
Sensorgram

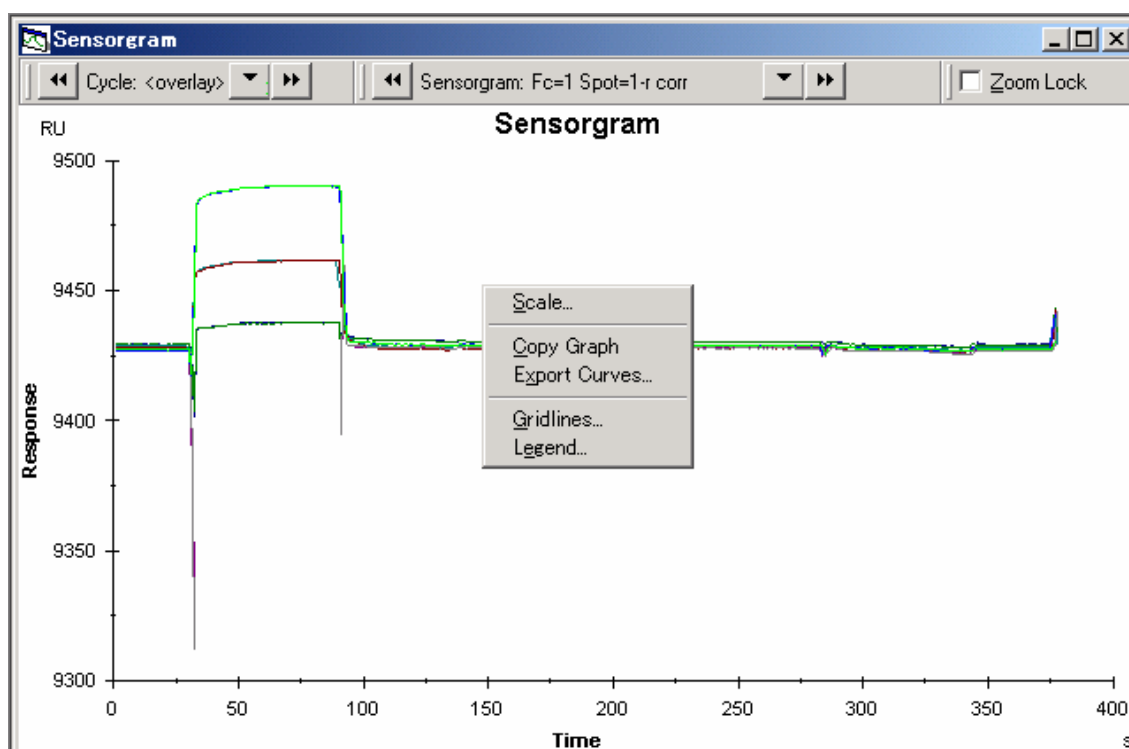
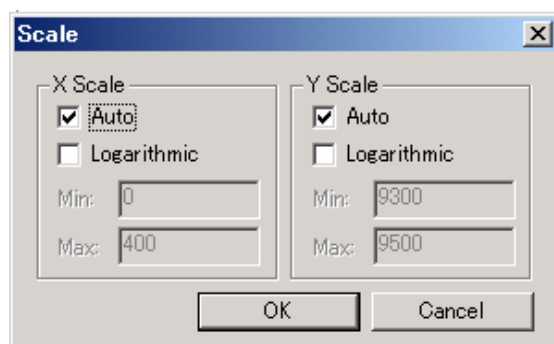
RU Response 9500 9450 9400 9350 9300

0 50 100 150 200 250 300 350 400 Time s

④ ベースライン合わせ

menu bar の **View** → **Adjust sensorgram...**を選択する。

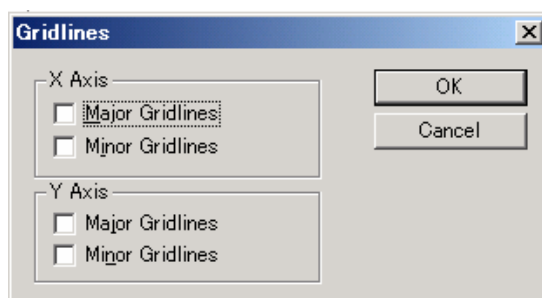
↓

X-axis の **Zero at report point** にチェックを入れ、**baseline** を選択する。同様に Y-axis に関しても **Zero at report point** にチェックを入れ、baseline を選択する。

↓

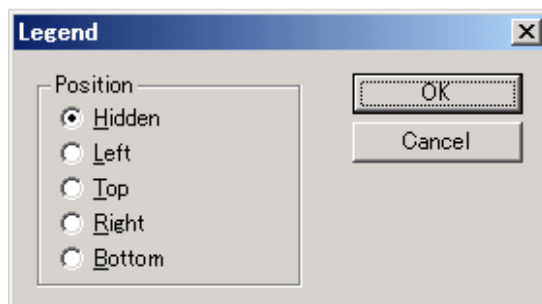
OK をクリックする。

⑤ スケールの変更

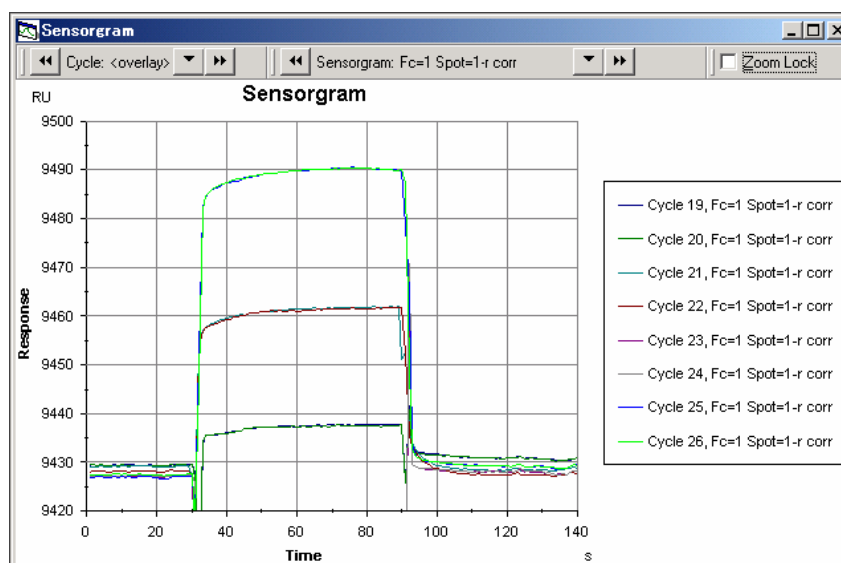
センサーグラムウィンドウ内でマウスを右クリックする。

Scale...を選択する。

X Scale、Y Scale の Auto のチェックを外し、それぞれ最小値 (Min:) 最大値 (Max:) を入力し、**OK** をクリックする。

⑥ グリッドラインの入力

センサーグラムウィンドウ内でマウスを右クリックし、**Gridlines...**を選択する。

OK をクリックする。

⑦ 凡例の表示

センサーグラムウィンドウ内でマウスを右クリックし、**Legend...**を選択する。

凡例を表示する場所を選択し、**OK** をクリックする。

いくつかの機能を使って表示させると、下のようなデータを作成することができる。

⑧ センサーグラム画像のコピー

センサーグラムウィンドウ内でマウスを右クリックし、**Copy Graph** を選択し、画像として一時保存する。引き続き、"Paint"等の他のアプリケーションソフトウェアを開き、**Past** し、貼り付ける。

"Paint"を使用する場合は、ビットマップ形式での保存が可能である。必要に応じて、そのファイルを保存し、別のコンピューターに持ち込む。

⑨ センサーグラムのテキスト形式保存

センサーグラムウィンドウ内でマウスを右クリックし、**Export Curves...** を選択する。Text 形式での保存ができるため、保存したファイルを"Exel"等の他のグラフ化ソフトで開き、再グラフ化する。

3-3. 解離定数、反応速度定数の算出（Compound Characterization）

反応速度定数(k_a,k_d)や解離定数(K_D)を求めるための Wizard である。少数のアナライトに対して濃度を振って測定する。

3-3-1. 測定プログラムの作成

Menu bar の **Run** → **Run Wizard**、または Tool bar の をクリックする。

Compound Characterization を選択し **Start...**をクリックする。

↓

測定シークエンスの各項目については 49 ページを参照する。Hit Selection での測定結果を参考に測定シークエンスを設定する。

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

次に測定の詳細設定を行う。

測定の詳細設定項目については 51 ページを参照のこと。

Flow rate 90μl/min を推奨する。

Number of cycles 5 回以上設定することが望ましい。

Run correction cycle every__sample cycles

標準は 2 種類（シリーズ）のサンプル測定終了ごとの補正である。Compound Characterization では、同一名のアナライトは連続して測定される。数段階濃度の同一アナライトの測定を 1 シリーズとしている。

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

アナライトの添加に関する詳細設定を行う。

Compound Characterization - Injection Parameters

Sample injection

Contact time: 60　Dissociation time: 120 (s)

☑ Extra wash after injection with: 50% DMSO

Stabilization period

Stabilization time: 30 (s)

Help　< Back　Next >　Close

設定後 Next >をクリックする。

↓

Compound Characterization - Sample Table

	Sample	Position	MW (Da)	Conc. µM	Conc. µg/ml
1	Furosemide	R1A1	331	0	0
2	Furosemide	R1A2	331	0.156	51.636e-3
3	Furosemide	R1A3	331	0.313	103.6e-3
4	Furosemide	R1A4	331	0.625	206.88e-3
5	Furosemide	R1A5	331	1.25	413.75e-3
6	Furosemide	R1A6	331	2.5	827.5e-3
7	Furosemide	R1A7	331	5	1.655
8	Furosemide	R1A8	331	10	3.31
9	Furosemide	R1A9	331	20	6.62
10	Furosemide	R1A10	331	2.5	827.5e-3
11	Sulfanilamide	R1B1	172	0	0
12	Sulfanilamide	R1B2	172	0.156	26.832e-3
13	Sulfanilamide	R1B3	172	0.313	53.836e-3
14	Sulfanilamide	R1B4	172	0.625	107.5e-3
15	Sulfanilamide	R1B5	172	1.25	215e-3
16	Sulfanilamide	R1B6	172	2.5	430e-3
17	Sulfanilamide	R1B7	172	5	860e-3
18	Sulfanilamide	R1B8	172	10	1.72
19	Sulfanilamide	R1B9	172	20	3.44
20	Sulfanilamide	R1B10	172	2.5	430e-3

Sample microplate type: 96 Well Microplate　Sample positioning: Manual

Reagent rack type: Reagent Rack 2

Help　Menu　< Back　Next >　Close

アナライトの名前、位置、分子量、濃度を入力する。

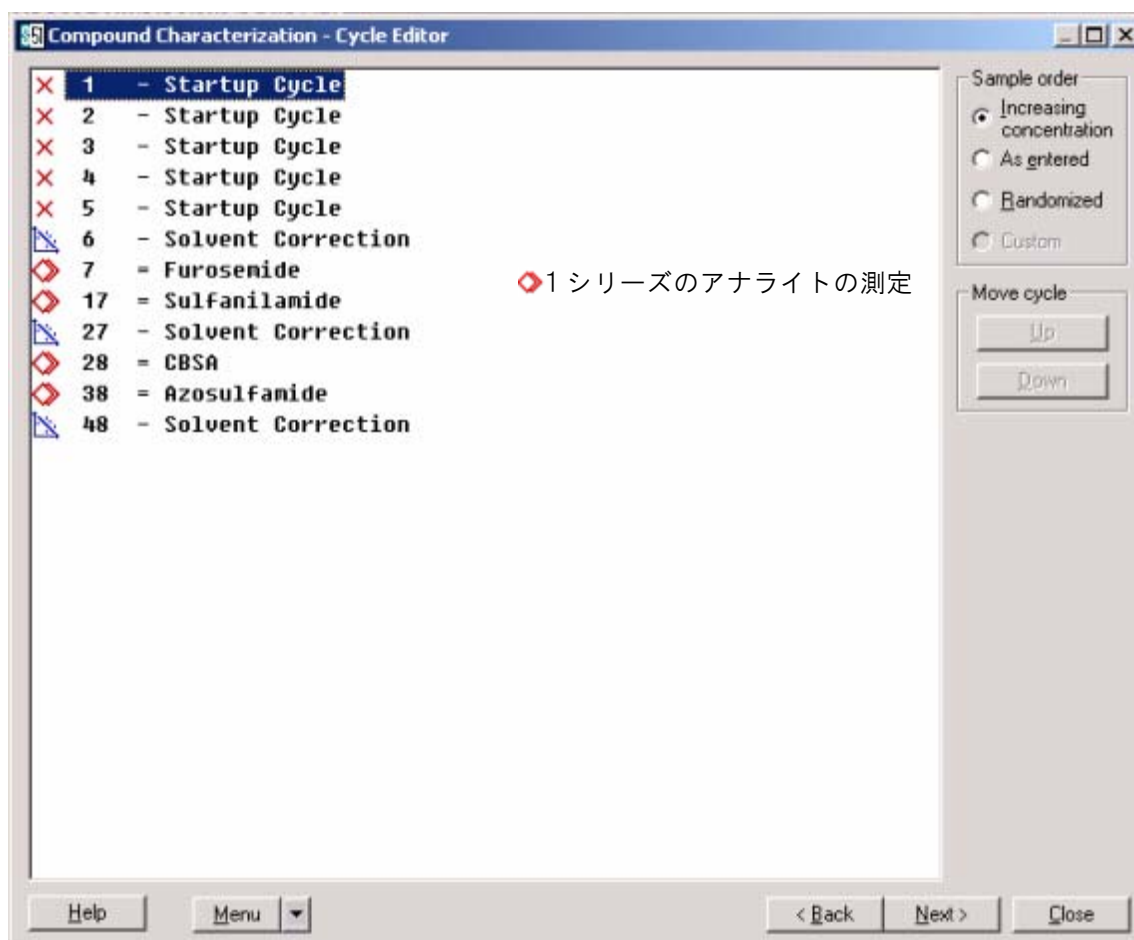
同一サンプルの濃度系列のうち必ず 1 回以上の 0 濃度の測定を加え、1 濃度に関しては duplicate（n=2）で測定する。

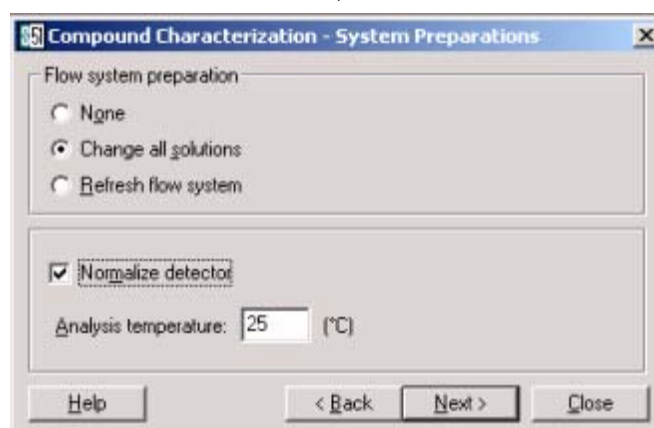
設定後 Next >をクリックする。

↓

必要に応じて、コントロールサンプルの設定を行う。設定後、Next >をクリックする。

↓

測定の順番が表示される。

設定後、**Next >**をクリックする。

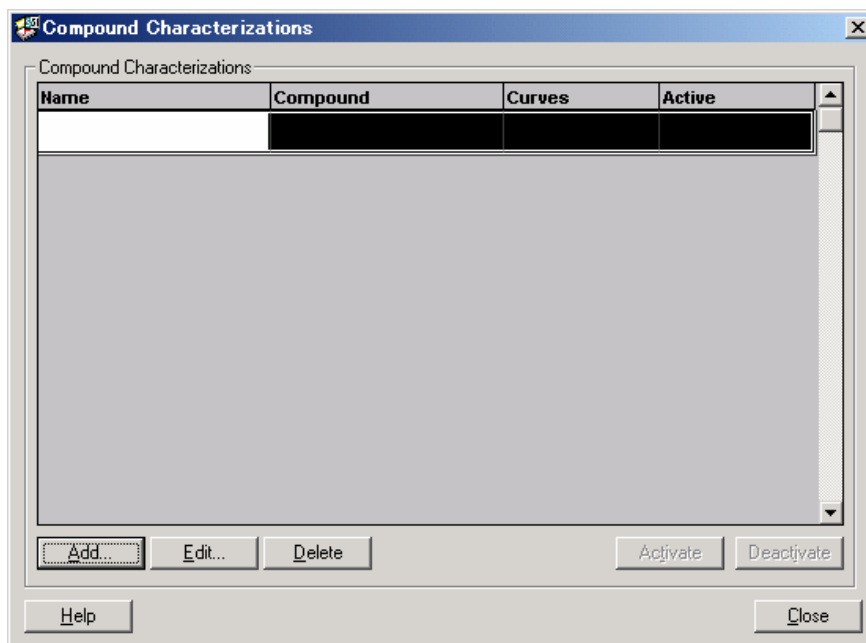
↓

Change all solutions にチェックを入れ設定後 **Next >**をクリックする。

↓

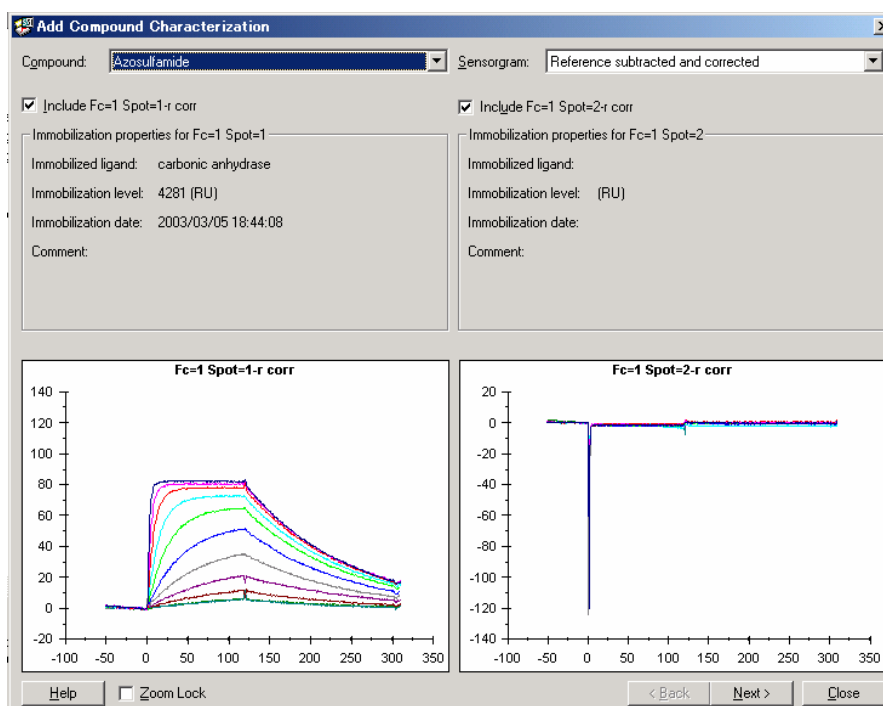
以後の操作は 2-1 章を参照し、測定を開始する。

3-3-2.　データ解析

まず、溶媒補正を行う。3-3-2 を参照のこと。

Menu bar 内 **Evaluation** → **Compound Characterizations...**をクリックする。

Add...をクリックする。

↓

同一サンプル名の濃度系列の重ね書きのウィンドウが表示される。

Compound 解析する化合物の選択

Sensorgram 解析するセンサーグラムの種類の選択

通常は **Reference subtract and corrected** を選択

Reference subtract（リファレンスを差し引いたセンサーグラム）

Reference subtract and corrected(リファレンスを差し引いて、さらに溶媒補正を行ったセンサーグラム)

Include Fc=1 Spot=1-r corr (Fc=1 Spot=2-r corr)：

解析するスポットの選択、解析が不要なスポットはチェックを外す。

Add Compound Characterization

Compound: Azosulfamide Sensorgram: Reference subtracted and corrected

☑ Include Fc=1 Spot=1-r corr ☐ Include Fc=1 Spot=2-r corr

Immobilization properties for Fc=1 Spot=1
Immobilized ligand: carbonic anhydrase
Immobilization level: 4281 (RU)
Immobilization date: 2003/03/05 18:44:08
Comment:

Immobilization properties for Fc=1 Spot=2
Immobilized ligand:
Immobilization level: (RU)
Immobilization date:
Comment:

Fc=1 Spot=1-r corr
140 120 100 80 60 40 20 0 -20
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350

Help ☐ Zoom Lock < Back Next > Close

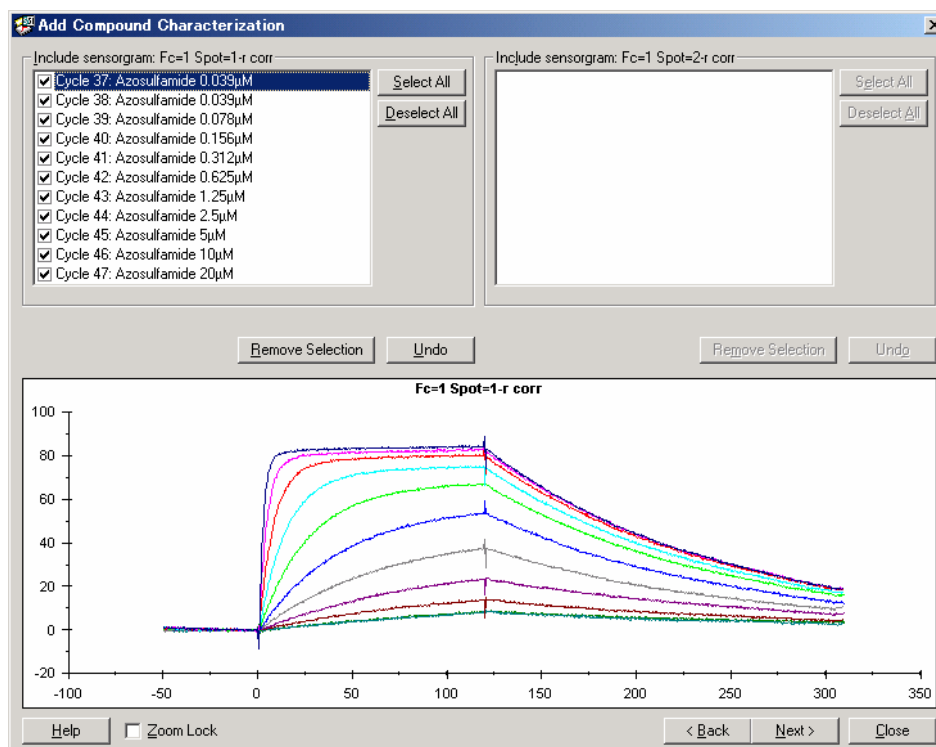
Next >をクリックする。

↓

アナライト濃度 0（ゼロ）M のセンサーグラムの引き算を行う。この操作で機械的なノイズ等アーティファクトの除去を行う。
Zero conc subtraction には、測定サイクル、中段のセンサーグラムはそのセンサーグラムである。

（注）同一アナライト内で、複数個の 0（ゼロ）M について測定を行っている場合、通常、平均化（**View average**）されたセンサーグラムが差し引かれる。特定の 0（ゼロ）M センサーグラムを使用する場合は、Zero conc subtraction から、不必要なセンサーグラムのチェックを外す。
アナライト濃度 0（ゼロ）M の測定中にエアーが混入したり、センサーグラムが不自然に乱れている場合は、その 0（ゼロ）M のセンサーグラムは引き算に採用しない。Zero conc subtraction 中のチェックを外す。排除したセンサーグラム以外の 0（ゼロ）M がない場合は、他のアナライトのゼロ濃度センサーグラムを引用する。Zero conc subtraction 右の **All compounds** にチェックを入れると測定内すべての 0（ゼロ）M センサーグラムが表示される。選択もしくは平均化（**View average**）して引き算する。

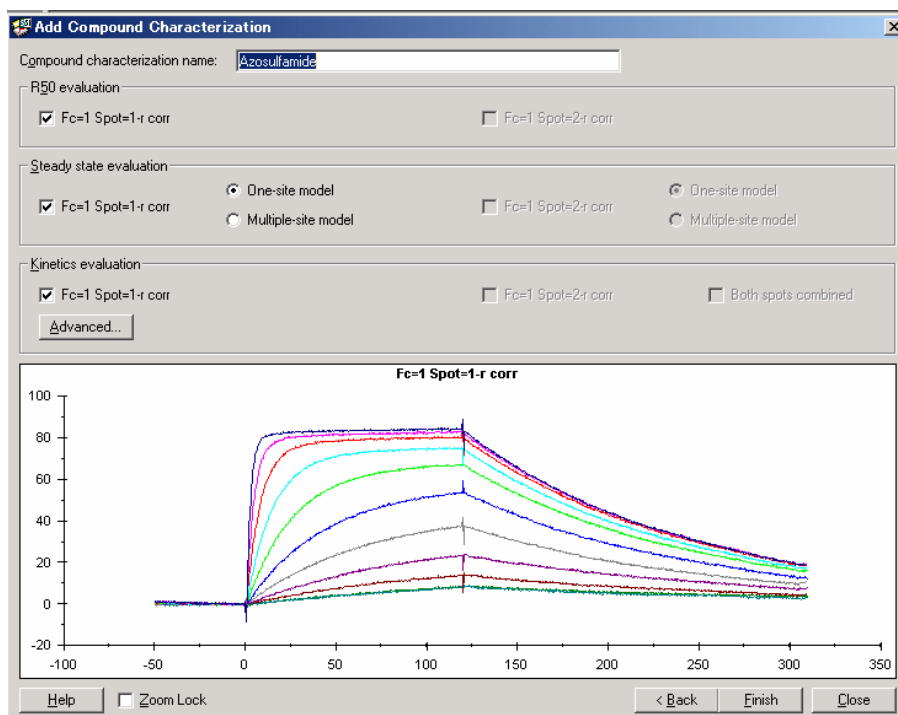
設定後 **Next >**をクリックする。

↓

Include sensorgram:全濃度系列のセンサーグラムリストが表示される。測定中にエアーが混入したり、不自然に乱れているセンサーグラムは、チェックを外し、解析から削除する。

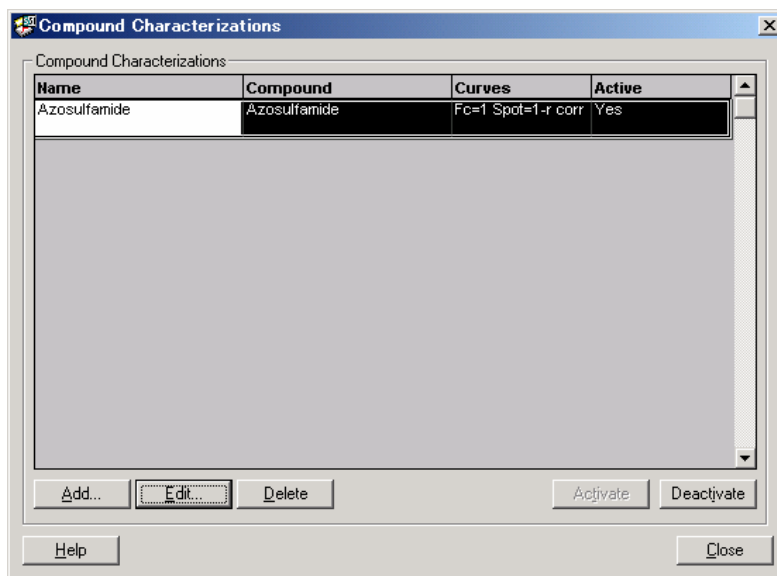
エアースパイクの削除

センサーグラム中にエアー混入によるスパイク状のノイズが含まれている場合には、その部分のみを削除することができる。Include sensorgram:内から目的のセンサーグラムのみを選択し、 1 本表示する。マウスの右ドラックにより削除するセンサーグラム上の最狭範囲を選択し、**Remove Selection** をクリックする。

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

算出するデータ（詳細は 99 ページ参照）、使用するモデルにチェックを入れ、**Finish** をクリックする。

↓

↓

続けて他のアナライトについて解析を行う場合には **Add...**をクリックし、同様の操作を実施する。解析を確認する場合には **Close** をクリックする。

↓

解析結果は、Evaluation Explorer の Compound characterizations フォルダに保存される。解析結果を見る場合は、そのファイルをダブルクリックする。

Azosulfamide

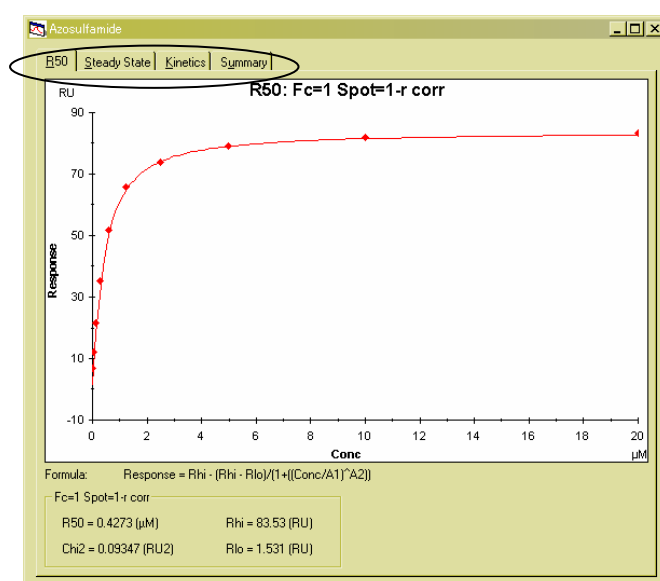
R50 | Steady State | Kinetics | Summary

R50: Fc=1 Spot=1-r corr

Formula: Response = Rhi - (Rhi - Rlo)/(1+((Conc/A1)^A2))

Fc=1 Spot=1-r corr

R50 = 0.4273 (µM) Rhi = 83.53 (RU)

Chi2 = 0.09347 (RU2) Rlo = 1.531 (RU)

上部タグをクリックして目的の解析結果を確認する。

R50

R50: Fc=1 Spot=1-r corr

Formula: Response = Rhi - (Rhi - Rlo)/(1+((Conc/A1)^A2))

Fc=1 Spot=1-r corr

R50 = 0.4273 (µM) Rhi = 84.65 (RU)

Chi2 = 0.09347 (RU2) Rlo = 2.656 (RU)

Steady State

Steady State: Fc=1 Spot=1-r corr

Fc=1 Spot=1-r corr

Formula: Response = Conc*Rmax/(Conc+KD)+offset

KD = 4.086e-7 (M) Rmax = 86.78 (RU)

Offset = -0.4616 (RU)

Chi2 = 0.7902 (RU2)

Kinetics

Kinetics: Fc=1 Spot=1-r corr

Residuals

Fc=1 Spot=1-r corr

Check Kinetic Data

Summary

R50 Evaluation

Fc=1 Spot=1-r corr

R50 0.4273 (µM)

Chi2 0.09347 (RU2)

Steady State Evaluation

Fc=1 Spot=1-r corr

KD 4.086e-7 (M)

Chi2 0.7902 (RU2)

Kinetics Evaluation

Fc=1 Spot=1-r corr

KD 2.960e-7 (M)

kd 7.716e-3 (1/s)

ka 2.607e4 (1/Ms)

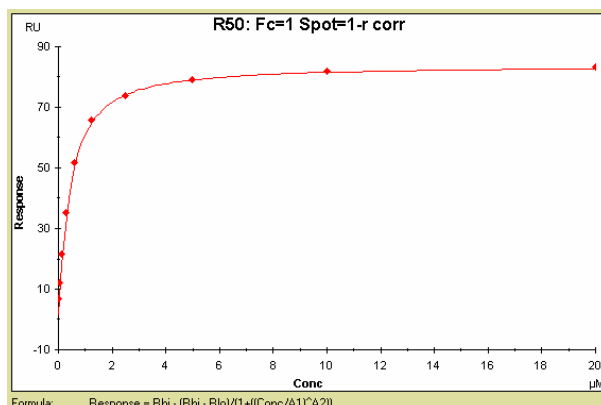
Chi2 2.252 (RU2)

Fc=1 Spot=1-r corr

Check Kinetic Data

解析内容

R50 evaluation

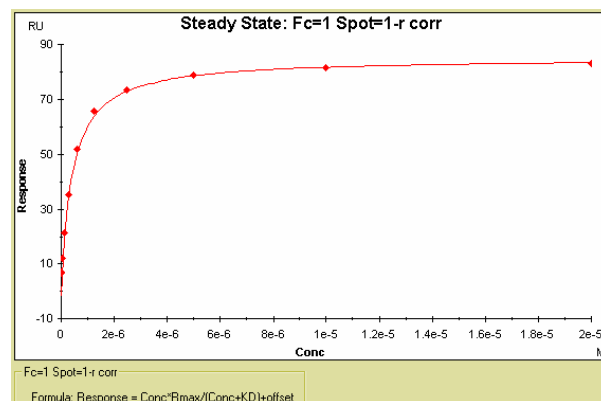
各アナライト濃度に対する結合レスポンスのプロットに 4-parameter 式をカーブフィットさせ、最大レスポンスの半分のレスポンスを示すアナライト濃度を算出。結合のストイキオメトリーは考慮されないため、1:1 結合反応にかかわらず算出可能。定量的なリード化合物のランク付けを行う目的で使用する。フィッティングしたプロットがスムースな曲線で、高濃度領域で完全に飽和しているようであれば、R50 は従来法で算出される B50 と近い値となる。

Steady state evaluation

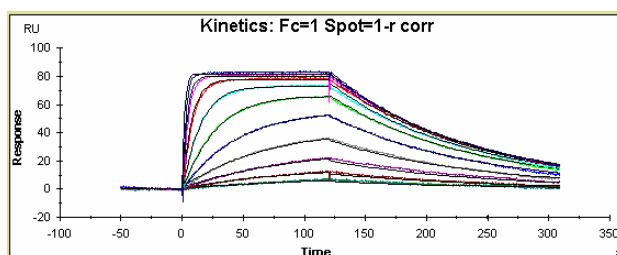
各アナライト濃度に対する結合レスポンスのプロットに平衡反応式をカーブフィットさせ、解離定数（K_D）を算出。

（One-site model）

結合様式が 1：1 の相互作用の場合に選択する。

（Multiple-site model）

リガンド上に 2 つの独立したアナライト結合部位が存在する場合に選択する。

Kinetics evaluation

得られたセンサーグラムを非線形最小二乗法によりカーブフィッティングし、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、解離定数(K_D)を算出する。非線形最小二乗法によるカーブフィッティングとは反応速度式に各種パラメーター（k_a ,k_d, Rmax 等）を代入していき、得られたセンサーグラムに対して最も良好にフィットするパラメーターを算出する方法である。

3-3-3.　解析結果の評価

（R50）
アナライトの最大結合量（RU）の半分の結合量（RU）を得るアナライト濃度。結合のストイキオメトリーは考慮されていない。

（Steady State）

one-site model

リガンドとアナライトの相互作用が 1:1 反応であれば、K_D 値は R50 値と同等の値になる。高濃度領域においては、リガンドに対するアナライトの非特異的吸着が加算されることがある。高濃度領域のプロットが Rmax に対して収束傾向になく、急激に右肩に上昇する場合は、解析から高濃度領域のプロットを排除し、再解析するのが望ましい。

multiple-site model

カーブを支配的な 1 つの高親和性成分と、それ以外の低親和性成分に二分割して解析する。

R50 Steady State Summary

Steady State: Fc=1 Spot=1-r

フィッティングカーブ2

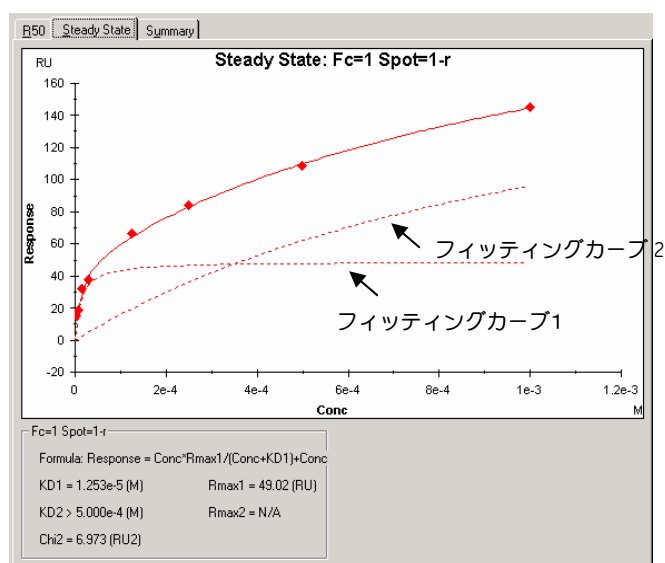
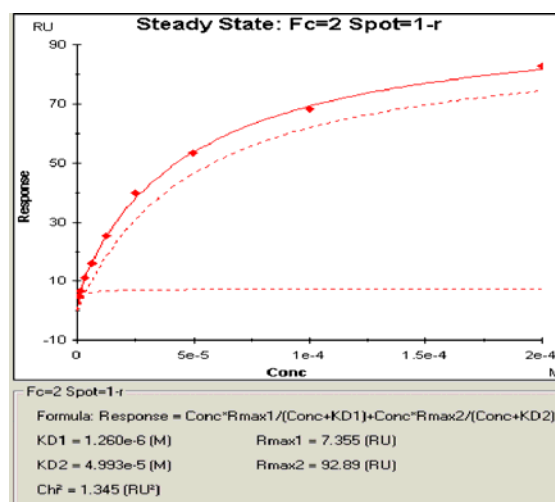
フィッティングカーブ1

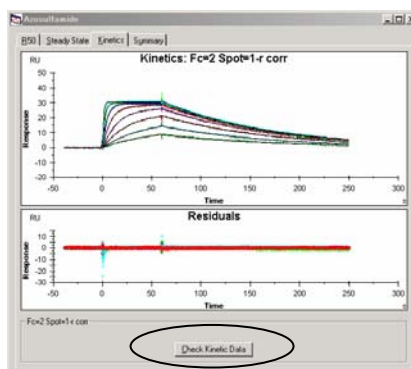
Fc=1 Spot=1-r

Formula: Response = Conc*Rmax1/(Conc+KD1)+Conc

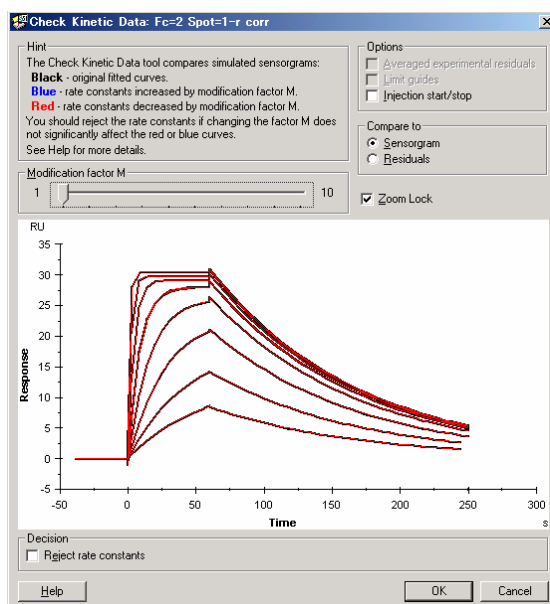
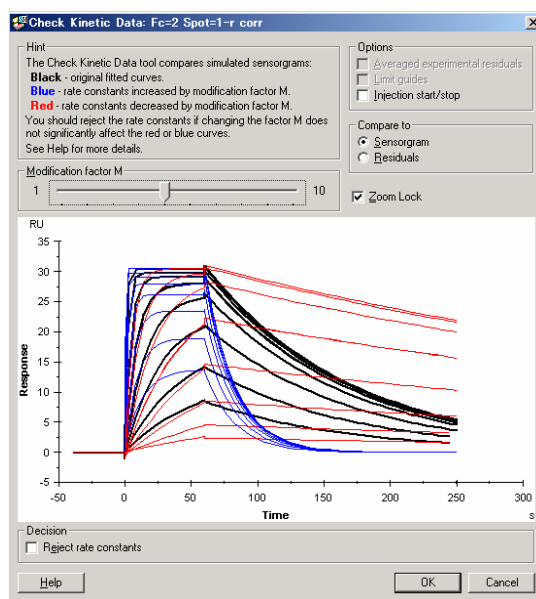
KD1 = 1.253e-5 (M)　Rmax1 = 49.02 (RU)

KD2 > 5.000e-4 (M)　Rmax2 = N/A

Chi2 = 6.973 (RU2)

上記のような場合、図中フィッティングカーブ 1 の K_D1、Rmax1 は算出され、2 の K_D2、Rmax2 は定数化できていない($K_D2>5.000e-4$)。この相互作用は K_D1 で示される高親和性相互作用と、K_D2 で示される定数化できない低親和性相互作用の和であると評価できる。

上図のように、両成分の K_D, Rmax が定数化された場合には Rmax に注意する。この例では Rmax1 と Rmax2 の値に 10 倍以上の差がある。リガンド上の 2 つの結合部位にアナライトが結合する場合、それぞれの Rmax は本来ほぼ同等になる。この場合は one-site model を使用して解析する。

（Kinetics）
実測データに黒色のフィッティングカーブが上書きされる。目視でフィッティングの度合いを確認する。定量的に評価する場合は residual plots で確認する。良好にフィッティングできていれば residual plots は Y=0 に対してランダムにプロットされる。
Biacore を含むすべての固相液相相互作用測定では、アナライトは 2 段階の過程を経て、リガンドに結合する。1 つはマストランスポートと呼ばれるアナライトのリガンド表面への拡散過程であり、もう 1 つは拡散したアナライトのリガンドへの反応過程である。反応が拡散より速い場合には、観察されるセンサーグラムは、拡散過程を反映したものとなり、そこから反応速度は得られない。この状態をマストランスポートリミテーション（Mass transport limitation(MTL)）という。MTL の影響を **Check Kinetic Data** で確認する。

Check Kinetics Data をクリックする。

↓

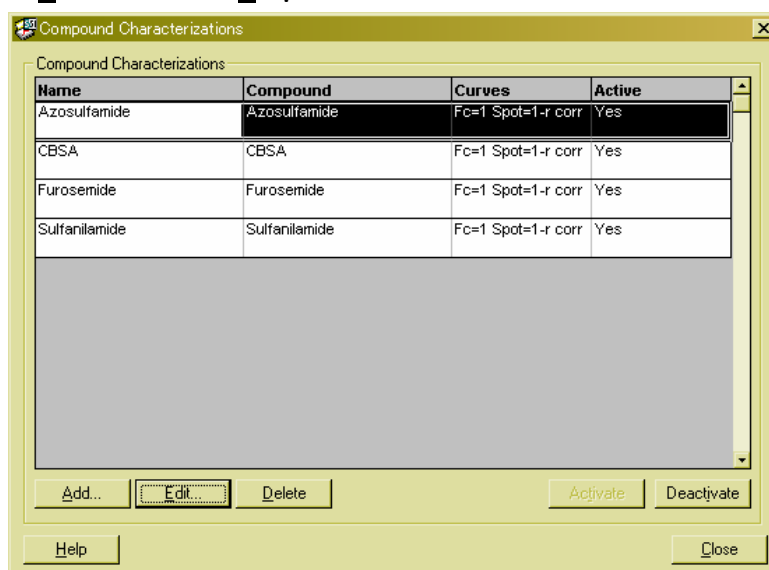
↓

Modification facter M のスライダーを左右に動かす。

青線と赤線が測定データ（黒線）から離れれば、解析結果は速度定数の変化に影響されるということになり、そのセンサーグラムには反応速度に関する情報が含まれることになる。青線と赤線が測定データ（黒線）からほとんど動かない場合には、MTL に支配されていることになるため、リガンドの固定化量を減らしたり、相互作用測定時の流速を上げるなどして、実験をしなおす必要がある。

3-3-4. 再解析

Menu bar 内 **Evaluation** → **Compound Characterizations...**をクリックする。

Compound Characterizations

Name	Compound	Curves	Active
Azosulfamide	Azosulfamide	Fc=1 Spot=1-r corr	Yes
CBSA	CBSA	Fc=1 Spot=1-r corr	Yes
Furosemide	Furosemide	Fc=1 Spot=1-r corr	Yes
Sulfanilamide	Sulfanilamide	Fc=1 Spot=1-r corr	Yes

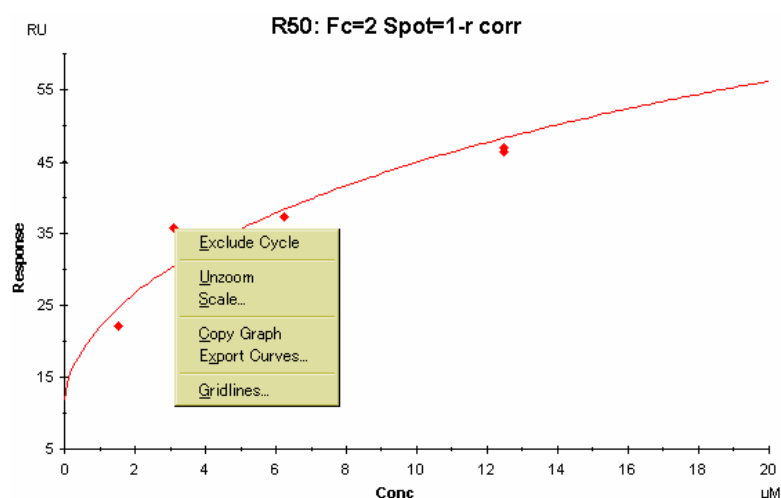
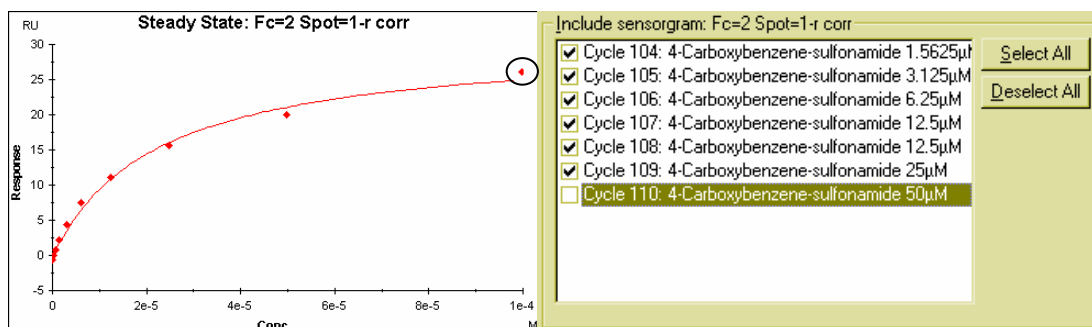
Add... Edit... Delete Activate Deactivate
Help Close

Add...もしくは **Edit...**をクリックする。再解析の結果を既存の結果と別ファイルとして保存する場合は **Add...**、既存の結果を編集し、上書き保存する場合は **Edit...**を選択する。

↓

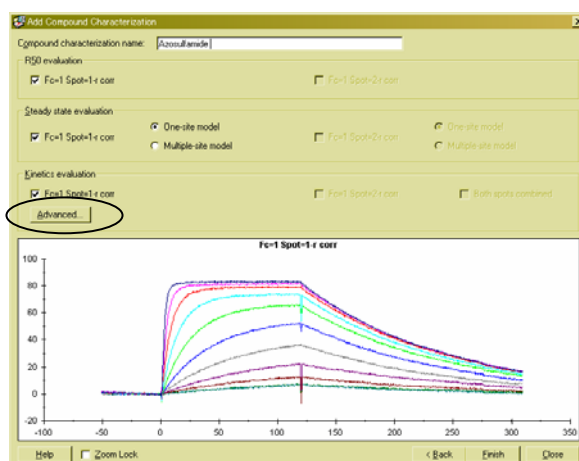
以下同様に解析を進める。

（R50、Steady State の再解析）

① プロットされたデータポイントのある 1 点がデータ系列から大きくかけ離れている場合は、その 1 点を排除して解析する必要がある。データポイント上でマウスの右ボタンを押し、**Exclude Cycle** を選択する。自動的に再解析される。

R50: Fc=2 Spot=1-r corr
RU
Response
Conc
μM
Exclude Cycle
Unzoom
Scale...
Copy Graph
Export Curves...
Gridlines...

② 高濃度アナライト領域では、特異的結合反応に非特異的吸着が加算された結合レスポンスが得られることがある。高濃度領域において、Rmax に収束傾向がなく、逆に上昇傾向にある場合は、高濃度アナライトを解析から排除するのが望ましい。

（Kinetics の再解析）

非線形最小二乗法によるフィッティングとは 1:1 binding model に各種パラメーター（k_a, k_d, Rmax 等）を代入し、実測のセンサーグラムに最も良好にフィットする値を定数化する。パラメーター代入方法には 3 通りある。Constant、Local、Global 代入である。アナライト濃度のように予め定まった値は、各センサーグラムに固定値(Constant)として代入する。Local は、各センサーグラム間で異なる値であり、溶液効果 (RI) がそれに相当する。結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、Rmax は Global 、つまり各センサーグラムに共通の値として代入する。

しかし、リガンドの活性が経時的に低下するような実験では、全センサーグラムにおいて Rmax を Global で代入しても良好にフィッティングしない。また、解離速度が速いセンサーグラムでは、アナライトの解離によるセンサーグラムの下降が RI (RU) として算出されてしまうことがあり、強制的に RI を Constant=0 で解析する必要がある。このように、実験状態を十分理解した上で、必要に応じて、各種パラメーターを再設定し解析しなおす。

①Rmax を Local に再設定

Kinetics evaluation から **Advanced...**をクリックする。

↓

Advanced Kinetics Settings

Fc=2 Spot=1-r corr | Fc=2 Spot=2-r corr | Both spots combined

Kinetic Parameter Settings

Rmax: Global (Replicate measurements coincide)

Initial value for ka: 1e5

Initial value for kd: 1e-3

Offset during injection (RI): Local

Initial value for kt2: 5.66e7

Help　OK　Cancel

Rmax を Local に変更する。

↓

Advanced Kinetics Settings

Fc=2 Spot=1-r corr | Fc=2 Spot=2-r corr | Both spots combined

Kinetic Parameter Settings

Rmax: Local

Initial value for ka: 1e5

Initial value for kd: 1e-3

Offset during injection (RI): Local

Initial value for kt2: 5.66e7

Help　OK　Cancel

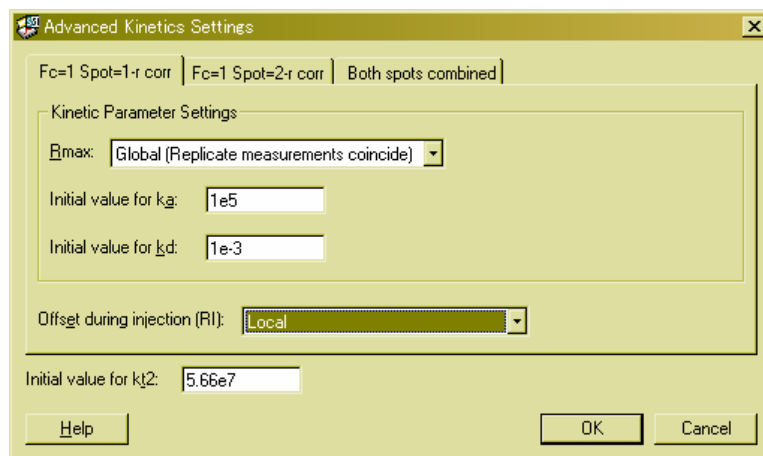
OK をクリックする。

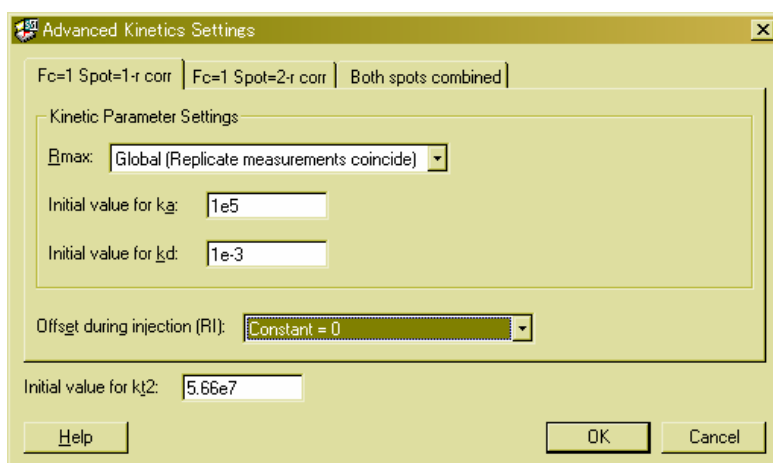
↓

通常通り、解析を続ける。

②RI を Constant=0 に再設定

Kinetics evaluation から **Advanced...**をクリックする。

↓

Offset during injection (RI)を Local に変更する。

↓

OK をクリックする。

↓

通常通り、解析を続ける。

3-4. タンパク結合率の算出

従来のタンパク結合率算出は、全血清もしくは全血漿に仕込んだ化合物濃度と遊離の化合物濃度の比率を評価することで行うが、Biacore によるタンパク結合率算出はヒト血清アルブミン（HSA）やα-酸性糖タンパク質（AGP）に対する化合物の解離定数（K_D 値）から換算することによって行う。そのために、解離定数（K_D 値）と、HSA の血漿濃度（健常人では 30-55 mg/ml ,450-850 μM の濃度幅で存在）また AGP 血漿濃度（健常人では約 1mg/ml , 約 24 μM で存在）が必要となる。

3-4-1. タンパク結合率（%- bound）の算出法

化合物 A とタンパク B との相互作用測定において、解離定数（K_D 値）は以下（1）式で記述される。

$$K_D = [A_{free}] [B_{free}] / [AB] \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

K_D	解離定数（M）
$[A_{free}]$	フリーの化合物濃度（M）
$[B_{free}]$	フリーのタンパク濃度（M）
[AB]	複合体の濃度（M）

（1）式において$[A_{free}]$、$[B_{free}]$は以下のように書き換えることができる。

$$K_D = ([A_{tot}] - [AB]) ([B_{tot}] - [AB]) / [AB] \cdots\cdots (2)$$

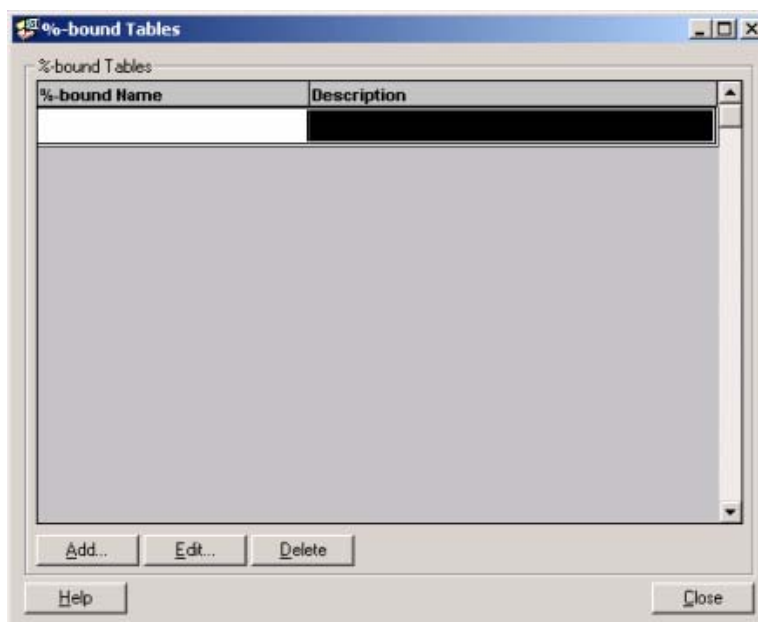
$[A_{tot}]$	化合物 A の総濃度（M）
$[B_{tot}]$	タンパク B の総濃度（M）

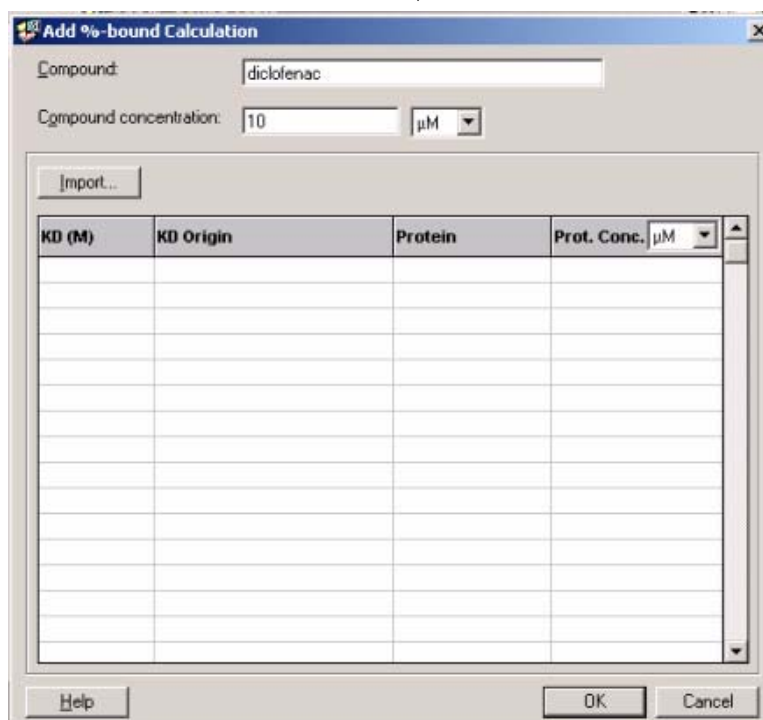
K_D は解析結果から既知であり、また$[A_{tot}]$は評価したい化合物濃度、$[B_{tot}]$は血清もしくは血漿中の標準的なタンパク濃度を使用すると、(2)式から[AB]を算出することができる。
以上から化合物 A の%-bound は(3)式で計算できる。

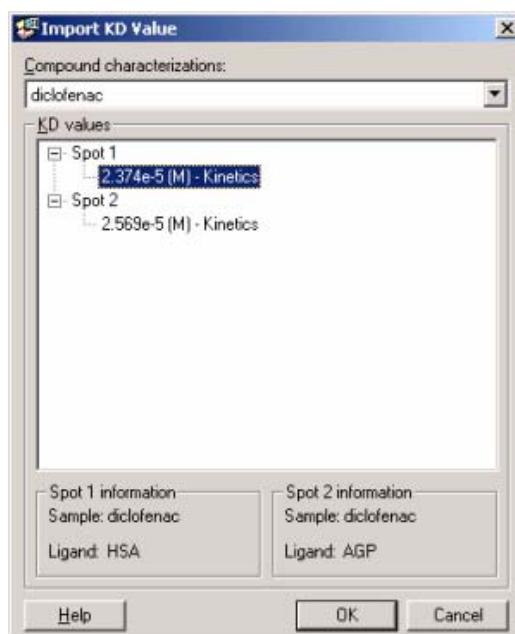
$$\% - bound = ([AB] / [A_{tot}]) \times 100 \cdots\cdots\cdots (3)$$

3-4-2. %- bound の算出手順

Compound Characterization にて解離定数（K_D 値）を算出する。

Menu bar の **Evaluation** → **%-bound Tables...**をクリックする。

Add...をクリックする。

↓

Compound:にタンパク結合率を計算する化合物名を入力し、Compound concentration:に濃度（通常 10μM）を入力し、**Import...**をクリックする。

↓

Compound characterizations:のプルダウンから目的の化合物、KD values から使用する K_D(M)値を選択し、**OK** をクリックする。

↓

Add %-bound Calculation に **K_D(M)，K_D Origin ,Protein** が自動的に代入される。**Prot.Conc.**にタンパク質の濃度（血中、もしくは血漿中の標準的な濃度）を入力する。通常、HSA の場合は 650 µ M、AGP の場合は 24 µ M を使用する。

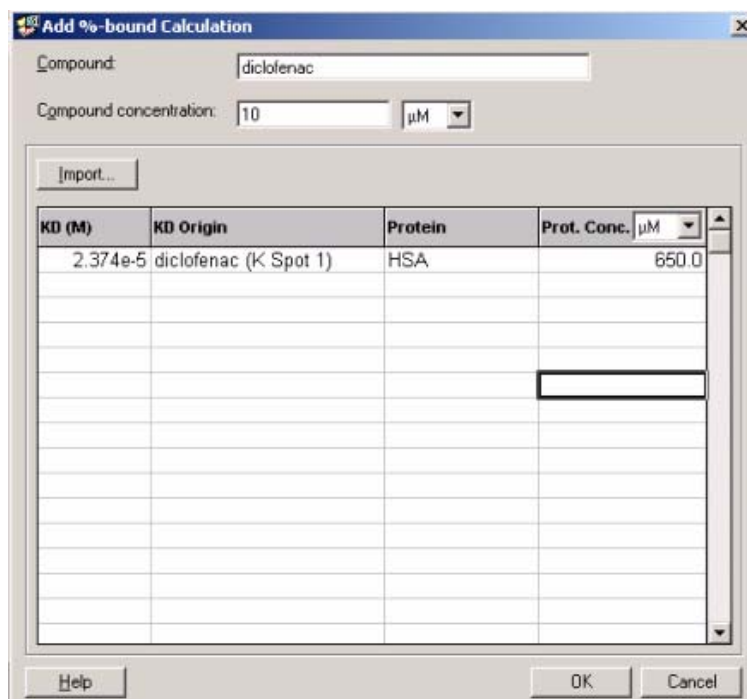
↓

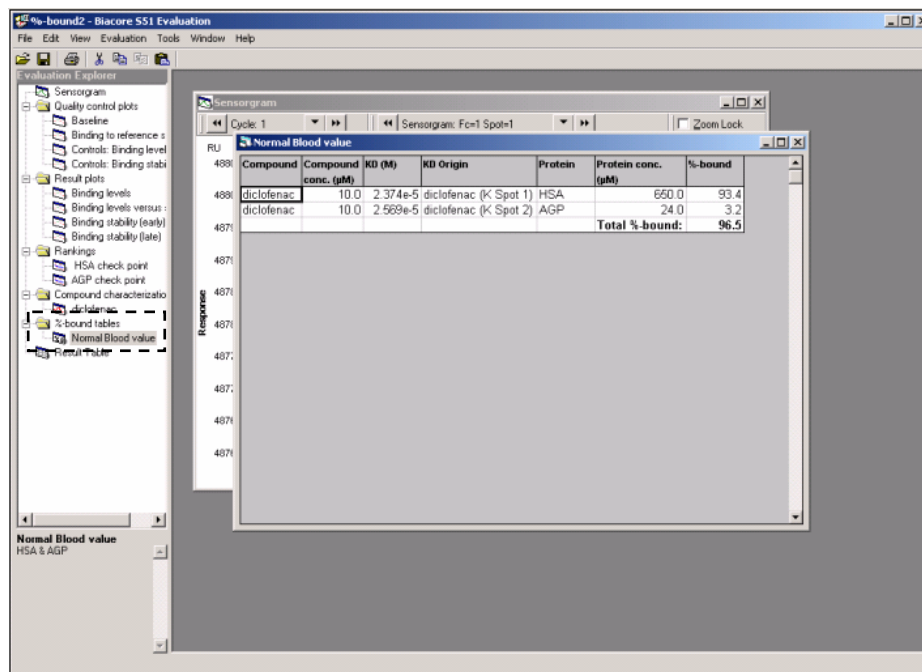
さらに、他のタンパク質に対する結合を加算する場合は、再度 **Import...**をクリックし同様の操作を行う。

OK をクリックする。

↓

Close をクリックする。

↓

画面左側の Evaluation Explorer 中の%-bound tables フォルダの下流に解析結果のファイルが追加される。

↓

ファイルをダブルクリックする。

↓

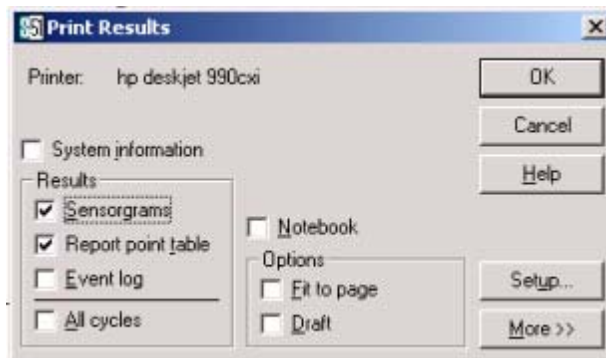
%-bound の計算結果が表示される。

Normal Blood value

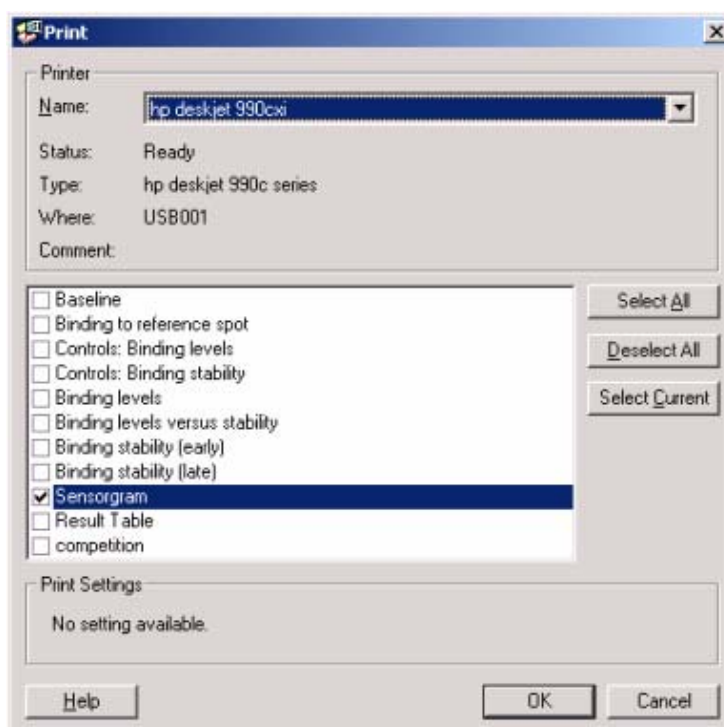
Compound	Compound conc. (µM)	KD (M)	KD Origin	Protein	Protein conc. (µM)	%-bound
diclofenac	10.0	2.374e-5	diclofenac (K Spot 1)	HSA	650.0	93.4
diclofenac	10.0	2.569e-5	diclofenac (K Spot 2)	AGP	24.0	3.2
					Total %-bound:	96.5

結果のプリントアウト

●Biacore S51 Control software

Menu bar の **File** → **Print…**をクリックする。

Results の印刷項目にチェックを入れ、**OK** をクリックする。

●Biacore S51 Evaluation software

Menu bar の **File** → **Print…**をクリックする。

印刷項目にチェックを入れ、**OK** をクリックする。（最初は Sensorgram が選択されている。）

4. メンテナンス

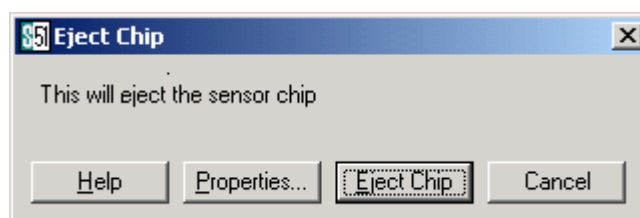
Tools → More Tools... → Maintenance Tools...中の目的メンテナンスを選択し実行する。メンテナンスは、メンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは破壊されてしまうので、必ずメンテナンスキット中のメンテナンスチップ、もしくは使い古しのセンサーチップを使用すること。

センサーチップの交換

Menu bar の **Tools → Eject Chip...** もしくは Tool bar からを選択する。

Eject Chip

This will eject the sensor chip

Help　Properties...　Eject Chip　Cancel

Eject Chip をクリックする。

↓

約 2 分後センサーチップポートが開く。センサーチップを取り出し所定のセンサーチップを挿入する。

↓

画面上に **Insert Chip** ウィンドウが表示されている。

Insert Chip

Sensor chip

Chip type: CM5

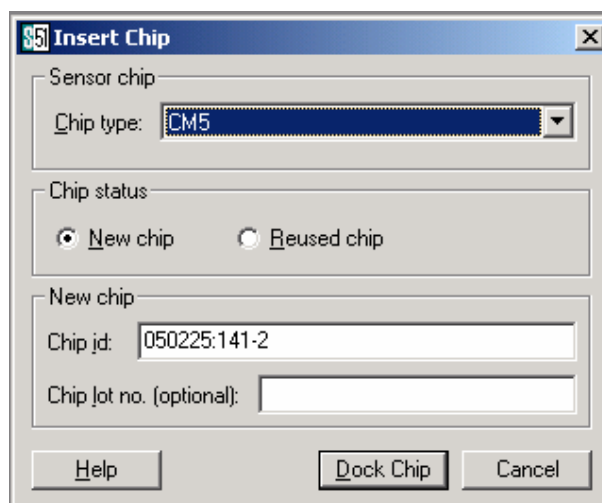
Chip status

New chip　Reused chip

New chip

Chip id: 050225:141-2

Chip lot no. (optional):

Help　Dock Chip　Cancel

必要事項を入力し、**Dock Chip** をクリックする。
（注）Chip type:内にはメンテナンスチップの選択項目はない。メンテナンスチップを使用する場合は、適当な種類のチップを選択する。

4-1. フローシステムのメンテナンス

Tools → More Tools…を選択する。

↓

Tools

Maintenance Tools
Desorb
Desorb and Sanitize
Superclean
Test Tools
Normalize
System Check
Service Tools

This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system.
Do not run this procedure below 20°C.
NOTE: Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.

Last Run Time: 06-Apr-03 21:00

Help | Perform tool timing | Start... | Cancel

①Desorb

吸着したタンパク質、化合物などの汚れを洗浄、洗浄領域は、ニードルから廃液チューブ間である。BIA メンテナンスキット内の試薬を用いる。ランニング緩衝液の位置には、**超純水**を使用する。

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS 溶液）（4℃で保存すると結晶が析出するので、室温保存。）

BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

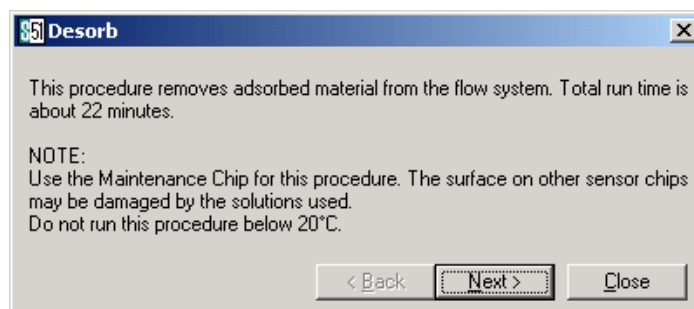
Desorb を選択して Start…をクリックする。

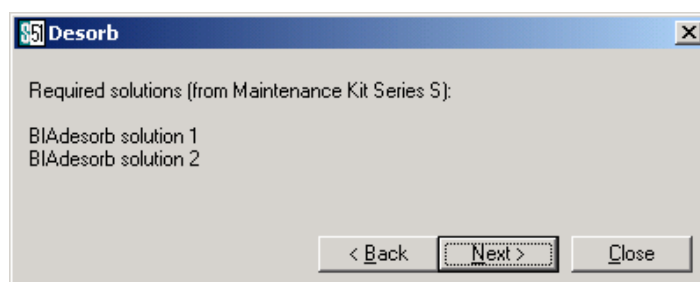
↓

Desorb

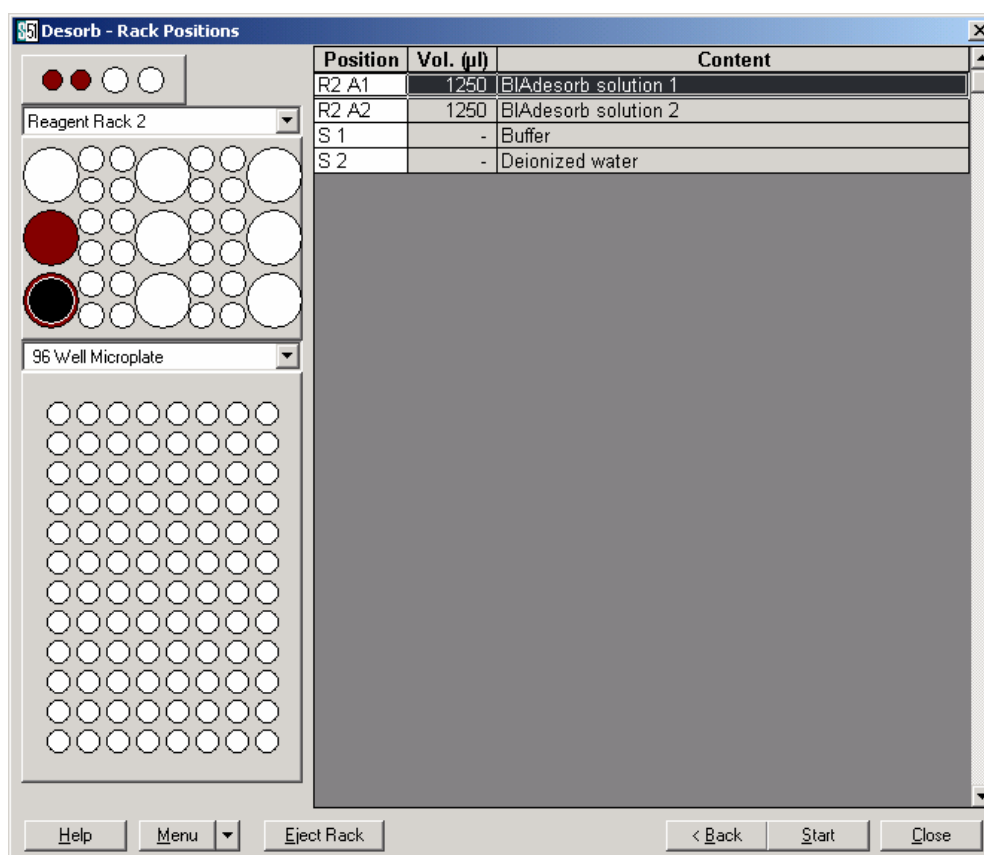
This procedure removes adsorbed material from the flow system. Total run time is about 22 minutes.

NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.

< Back | Next > | Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓

確認後 **Next >**をクリックする。

↓

16 mm のガラスバイアルに BIAdesorb solution1、BIAdesorb solution2 をそれぞれ **1250** µl 入れて所定の位置にセットする。

Start をクリックする。

（注）終了後の装置は自動的に Standby flow の状態になる。この状態で 3～4 時間放置することをお奨めする。

②Desorb and Sanitize

吸着したタンパク質、化合物などの汚れを洗浄し、カビ等の繁殖を防止する。
洗浄領域は、インレットチューブから廃液チューブ間の全送液エリアである。
BIA メンテナンスキット内の試薬を用いる。
BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS 溶液）（4℃で保存すると結晶が析出するので、室温保存。）
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）
BIAdisinfectant solution 3.8 ml を超純水 50 ml で希釈して使用

Desorb and Sanitize を選択して **Start...**をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize

This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system. The procedure is divided into four steps. Total run time is about one hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.

NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.

< Back　Next >　Close

内容を確認後 **Next >**をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize

Required solutions (from Maintenance Kit Series S):

BIAdesorb solution 1,　about 25 ml
BIAdesorb solution 2,　about 25 ml
BIAdisinfectant solution, about 43 ml

< Back　Next >　Close

確認後 **Next >**をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize

Step 1

Place BIAdesorb Solution 1 in the reagent compartment and insert all pump inlet tubings.

< Back　Start　Close

Buffer compartment door を開け、**BIAdesorb Solution1** ボトルをセットし、6 本すべてのチューブを挿入する。セット後、**Start** をクリックする。

↓

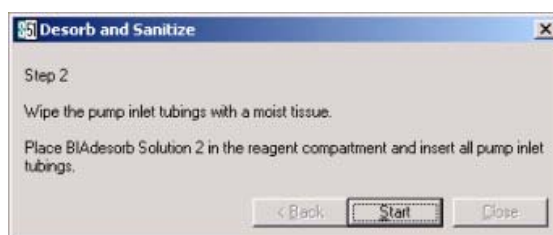
ステップ 1 終了後、自動的にステップ 2 のウィンドウが表示される。

Desorb and Sanitize

Step 2

Wipe the pump inlet tubings with a moist tissue.

Place BIAdesorb Solution 2 in the reagent compartment and insert all pump inlet tubings.

< Back Start Close

BIAdesorb Solution 2 ボトルに変更し、同様にすべてのチューブを挿入する。セット後、**Start** をクリックする。

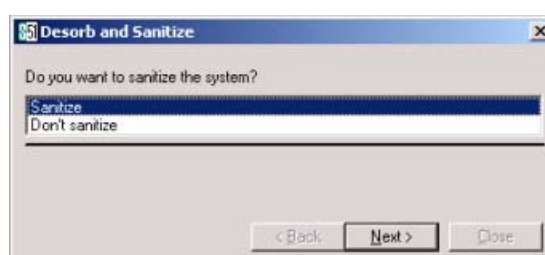
↓

ステップ 2 終了後、Sanitize の実施を選択するウィンドウが表示される。

Desorb and Sanitize

Do you want to sanitize the system?

Sanitize
Don't sanitize

< Back Next > Close

Sanitize を選択して **Next >**をクリックする。

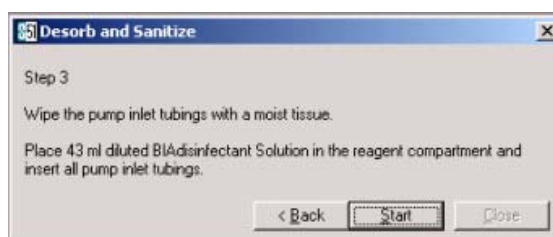
↓

Desorb and Sanitize

Step 3

Wipe the pump inlet tubings with a moist tissue.

Place 43 ml diluted BIAdisinfectant Solution in the reagent compartment and insert all pump inlet tubings.

< Back Start Close

超純水で希釈した **Sanitize** ボトルをセットし、同様にすべてのチューブを挿入する。セット後、**Start** をクリックする。

↓

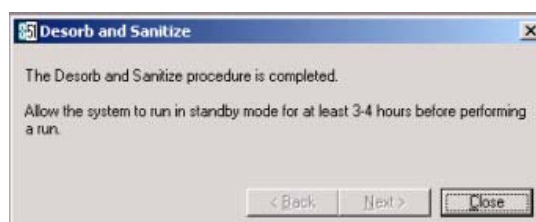
約 30 分かけて Sanitize を実行する。
Sanitize 終了後、**Step4** で、**超純水**ボトルに変更し、同様にすべてのチューブを挿入する。セット後、**Start** をクリックする。

↓

Desorb and Sanitize

The Desorb and Sanitize procedure is completed.

Allow the system to run in standby mode for at least 3-4 hours before performing a run.

< Back Next > Close

Close をクリックし、洗浄を終了する。終了後の装置は自動的に Standby flow の状態になる。この状態で 3～4 時間放置することをお奨めする。

③Superclean

メンテナンスの中で最も強力な洗浄、洗浄領域は、ニードルから廃液チューブ間である。使用する試薬は、調製後、0.22 μm のフィルターでろ過する。

1% acetic acid

0.2M sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

6M guanidine-HCl

10 mM HCl

Superclean を選択して **Start...**をクリックする。

Superclean

This procedure cleans the flow system. Total run time is about 90 minutes.

NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Use filtered deionized warm water (40-50°C) as running buffer.

< Back　Next >　Close

確認後 **Next >**をクリックする。

↓

Superclean

Required solutions:

1% acetic acid
0.2 M sodium bicarbonate (NaHCO3)
6 M guanidine-HCl
10 mM HCl

< Back　Next >　Close

確認後 **Next >**をクリックする。

↓

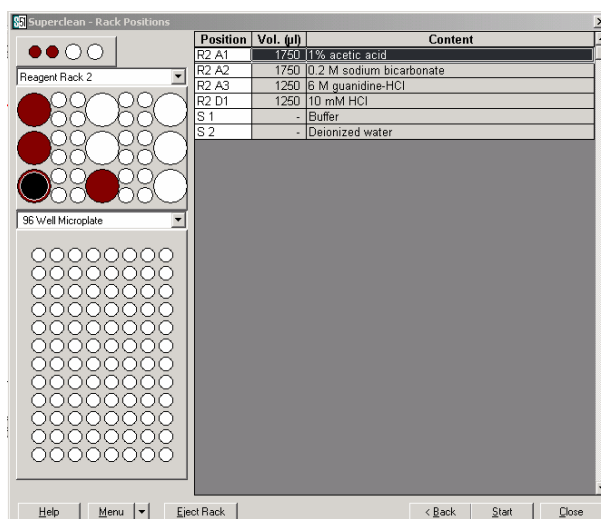
16 mm のガラスバイアルに各試薬を必要量入れ、所定の位置にセットする。

Superclean - Rack Positions

Reagent Rack 2

96 Well Microplate

Position	Vol. (µl)	Content
R2 A1	1750	1% acetic acid
R2 A2	1750	0.2 M sodium bicarbonate
R2 A3	1250	6 M guanidine-HCl
R2 D1	1250	10 mM HCl
S 1	-	Buffer
S 2	-	Deionized water

Help　Menu　Eject Rack　< Back　Start　Close

Start をクリックする。終了後の装置は自動的に Standby flow の状態になる。

4-2. システムチェック

診断を行うプログラムである。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後、実行する。定期的に実行することをお奨めする。

（必要な試薬、消耗品）

新品の CM5 センサーチップ　（BR-1003-99）1 枚

HBS-N buffer　（BR-1003-69）1 パック

メンテナンスキット中の BIAtest solution

（注）このチェックに使用したセンサーチップは、新品のセンサーチップとして実験可能。

Tools → More Tools...を選択する。

Tools

Maintenance Tools
Desorb
Desorb and Sanitize
Superclean
Test Tools
Normalize
System Check
Service Tools
Flow System Wash
Software Problem Report

Checks for leakage and tests pumps, blank injections and noise.
Total run time is about 45 minutes.
NOTE: This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5. Running buffer should be HBS-N.

Last Run Time: 15-Jul-03 16:26

Help　Start...　Cancel

Test Tools の **System Check** を選択して **Start** をクリックする。

↓

System Check

Select test(s) to run.

This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5 and with HBS-N as running buffer. Choose Close if you need to change the sensor chip, reset the temperature or change running buffer.

A: Reagent pumps and Blank injection
B: Refractometer performance and flow cell leakage
C: Syringe pumps
D: Hydrodynamic addressing
E: Noise

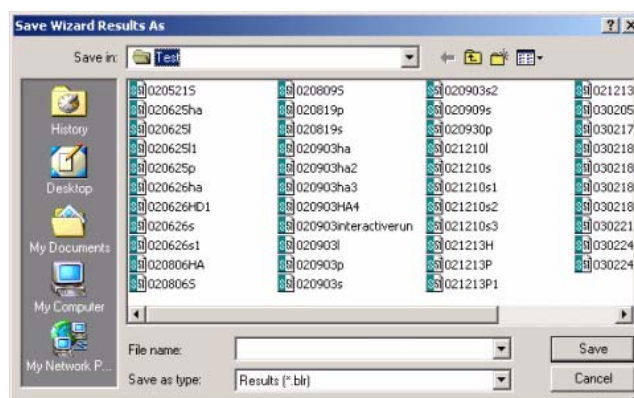
Tests if the peristaltic pumps are in order and that a sample injection with buffer from the Reagent supply block is all right.

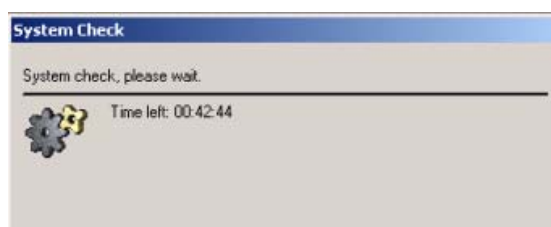
< Back　Next >　Close

全項目にチェックを付け、**Next >**をクリックする。

↓

Series S BIAtest solution を必要量、所定の位置にセットし、**Start** をクリックする。

↓

ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。

↓

約 40 分かけてシステムチェックを実行する。

↓

終了後、チェックシートが表示される。

System Check

System Check

Name: ________________ Date: ________

Created By:	Biacore S51 Control Software	**Version:**	1.1
Instrument id:	10129	**Configuration:**	IFC102
Run Date:	07-Apr-2003	**Evaluation Date:**	07-Apr-2003
File:	030407	**Temperature:**	25.0 °C

A. Reagent pumps

	(-50 - 50 RU)		
S1	-2	4	**OK**
	(-2500 - -1499 RU)		
S2	-1983	-2003	**OK**
S3	-2080	-1990	**OK**
S4	-2034	-1997	**OK**

B. Refractometer

		BIAtest solution (22000-23000 RU)		Baseline level	
Fc1	Spot 1	22352	**OK**	28264	
	Ref	22148	**OK**	28055	
	Spot 2	22083	**OK**	28052	
Fc2	Spot 1	22437	**OK**	28079	
	Ref	22432	**OK**	28095	
	Spot 2	19847	**Bad**	34061	
	Average	21883		29101	
	Stdev			2431	**(< 1000) Bad**

Flow cell leakage

86 **(< 200) OK**

C. Syringe pumps

Rise **Fall**

Print... < Back Next > Close

各チェック項目について測定値が正常値範囲内であれば **OK**、範囲外であれば **Bad** と診断される。**Bad** が表示されている項目がある場合には弊社技術サービス部に連絡する。

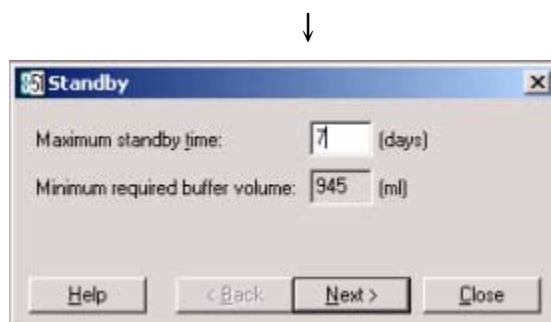
5. シャットダウン

5-1. 実験の終了

実験終了後、3 日以内に使用する場合には、①の Standby flow 状態で、3 日以上使用しない場合には、②の電源を落として終了をする。

① Standby flow 状態での放置

Tools → Standby をクリックする。

↓

希望の放置日数（最大日数 7 日間）を入力するとランニング緩衝液の必要量が表示される。

↓

必要量のランニング緩衝液をセット後、**Next >**をクリックする。

② 電源を落として終了

Desorb and Sanitize を行った後に、実行する。

（必要な試薬）

70%エタノール

Tools → Shutdown...をクリックする。

確認後、**Next >**をクリックする。

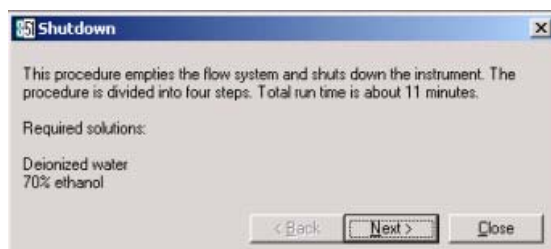
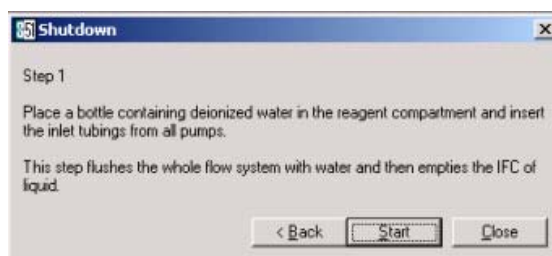
↓

Shutdown

Step 1

Place a bottle containing deionized water in the reagent compartment and insert the inlet tubings from all pumps.

This step flushes the whole flow system with water and then empties the IFC of liquid.

< Back　Start　Close

Buffer compartment door を開け超純水ボトルをセットし、6 本すべてのチューブを挿入し、**Start** をクリックする。

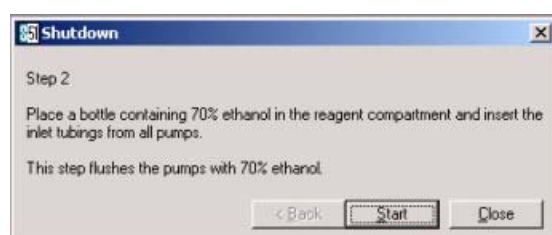
↓

Shutdown

Step 2

Place a bottle containing 70% ethanol in the reagent compartment and insert the inlet tubings from all pumps.

This step flushes the pumps with 70% ethanol.

< Back　Start　Close

超純水ボトルを 70%エタノールボトルに交換し、すべてのチューブを差し換え、**Start** をクリックする。

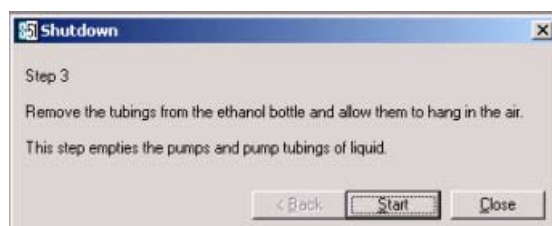
↓

Shutdown

Step 3

Remove the tubings from the ethanol bottle and allow them to hang in the air.

This step empties the pumps and pump tubings of liquid.

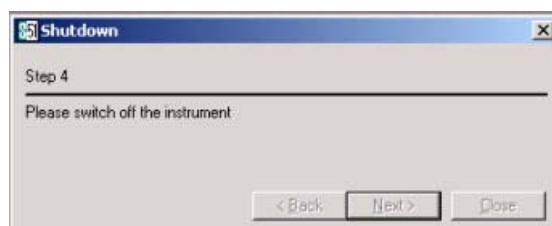
< Back　Start　Close

70%エタノールボトルを取り出す。チューブはそのまま空気にさらした状態で **Start** をクリックする。

↓

Shutdown

Step 4

Please switch off the instrument

< Back　Next >　Close

センサーチップポートが自動的に開く。センサーチップを抜き取った後センサーチップポートを閉じる。

↓

システムの電源をオフにする。コントロールソフトウェアをシャットダウンし、コンピューター、モニター、プリンター等の電源をオフにする。

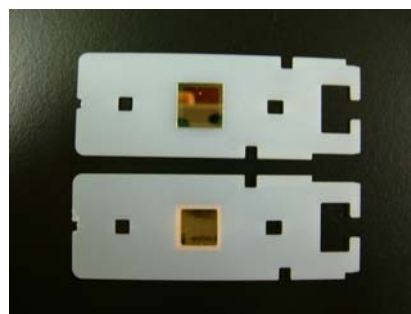
5-2. センサーチップの保存

保存中に変性する場合があるので、再使用の際には活性を確認すること。

①Dry 状態での保存
安定なタンパク質を固定化したセンサーチップの保存に用いる。取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4 ℃で保存する。

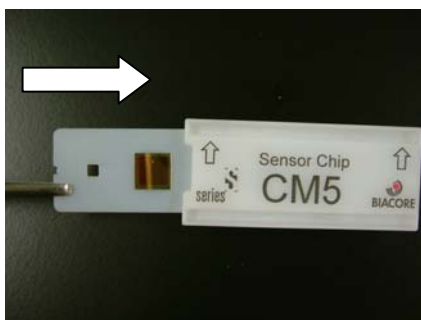
②Wet 状態での保存
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを HBS-N 等保存用緩衝液を入れた容器（25 ml 容のふた付きプラスチック管等）に浸し、4 ℃で保存する。

ピンセットでカバーからシートを抜き出し、シートのみ保存用緩衝液に浸して保存する。

窪んでいる面はリガンドが固定化されている面である。平らな面は検出器が接触する。再使用時、カバーにシートを納める際は、シートの水分を取り除く。検出面は、キムワイプで拭いた後、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭く。さらにキムワイプ水分を取り除く。固定化面はキムワイプをこより状に細くして、金膜の中央部分を触らないように、四隅から溶液を吸収する。

検出面が表になる向きで、ピンセットでカバーの左側から挿入する。固定化面を表にして挿入した場合には、完全にシートは入りきらない。

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告	誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。
注意	誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止	⃠は、してはいけない「禁止」を示します。
❗	❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

- ●加工しない ●束ねない ●ねじらない
- ●折らない ●物をのせない ●加熱しない
- ●無理に曲げない

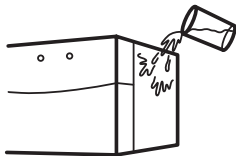
破損して火災・感電の原因になります。

根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない

ショート・感電の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

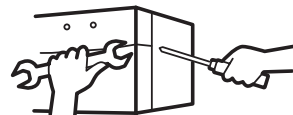
禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。

指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

設置時は、次のような場所には置かない

禁止

- ●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
- ●油煙や湯気が当たる場所
- ●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
- ●熱器具の近く　●高温になる場所
- ●吸・排気口をふさぐような場所

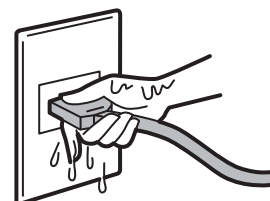
このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない

禁止

感電の原因になります。

水平で丈夫な場所に設置する

水平

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

プラグを持つ

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

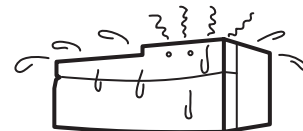
⚠ 低温室で使用する場合の注意

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

電源を入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）

電源を入れない

感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く